

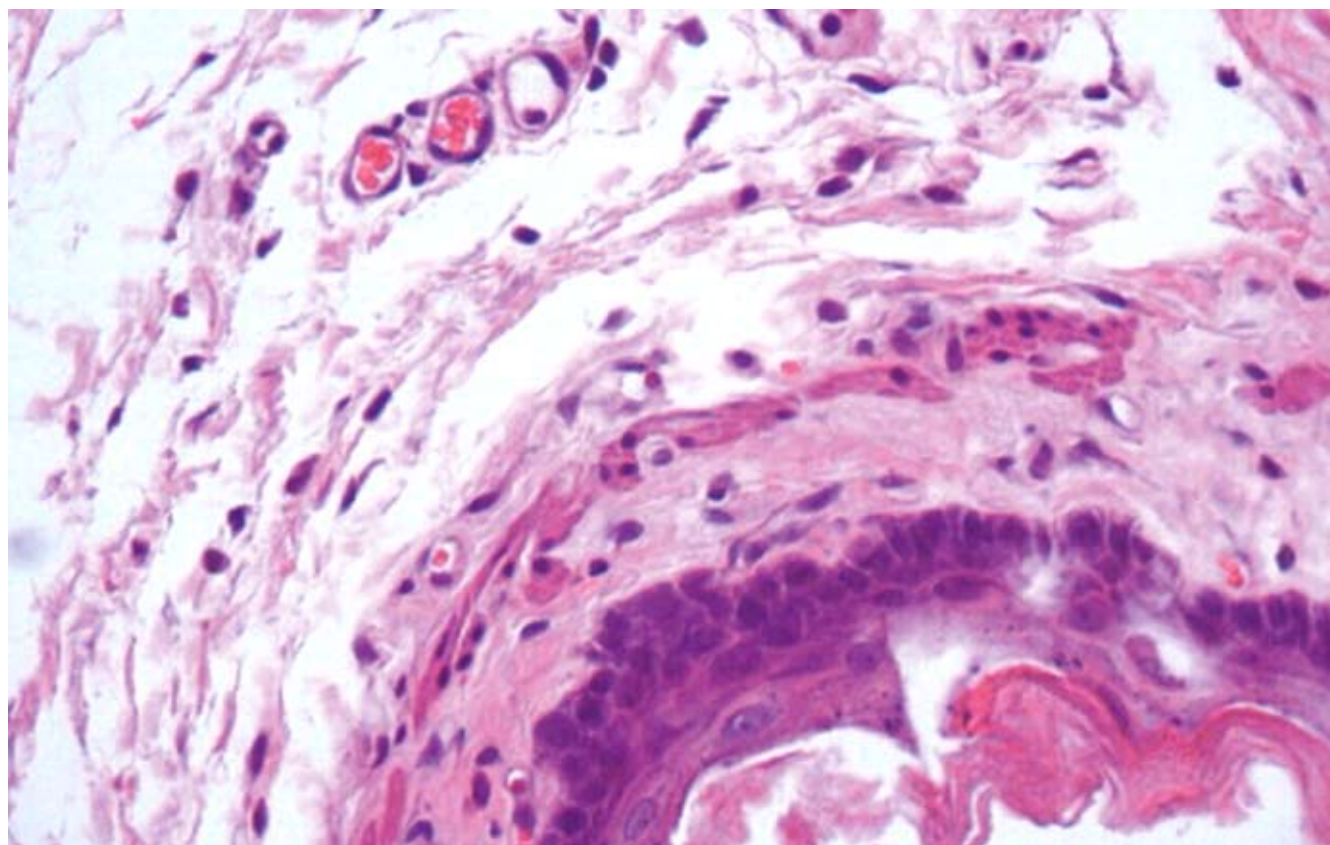
ISSN 1009-3079 (print)  
ISSN 2219-2859 (online)

# 世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2013 年 3 月 28 日      第 21 卷      第 9 期      (Volume 21 Number 9)**



**9/2013**

ISSN 1009-3079



《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被《Chemical Abstracts》，《EMBASE/Excerpta Medica》，《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》编辑委员会成员,由488位专家组成,分布在30个省市,自治区,特别行政区。其中,上海市81位、北京市70位、广东省40位、江苏省38位、辽宁省24位、陕西省22位、黑龙江省20位、湖北省18位、天津市16位、吉林省15位、湖南省14位、福建省13位、山东省13位、广西壮族自治区11位、河北省10位、四川省10位、浙江省10位、重庆市9位、安徽省8位、江西省8位、贵州省7位、新疆维吾尔自治区6位、云南省6位、海南省2位、河南省3位、甘肃省2位、宁夏回族自治区2位、山西省2位、内蒙古自治区1位和香港特别行政区1位。

### 总顾问

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

### 名誉主编

潘伯荣教授

### 主编

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

### 编委

#### 消化内科学

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

冯志杰主任医师

傅春彬主任医师

甘华田教授

高凌副教授

戈之铮教授

关玉盘教授

关晓辉主任医师

郭晓钟教授

郝建宇教授

郝丽萍副教授

何继满教授

何松教授

洪天配教授

黄培林教授

黄晓东主任医师

黄颖秋教授

黄缘教授

李国忠教授

江米足教授

姜春萌教授

姜慧卿教授

姜相君主任医师

金瑞教授

蓝宇教授

李淑德教授

李瑜元教授

李玉民教授

廖家智副主任医师

林志辉教授

刘冰熔教授

刘凤斌教授

刘改芳主任医师

刘海峰主任医师

刘海林主任医师

刘亮明副教授

陆伦根教授

马红主任医师

马欣主任医师

毛恩强教授

毛高平教授

孟庆华教授

缪应雷主任医师

倪润洲教授

欧希龙副教授

潘秀珍教授

潘阳林副教授

朴云峰教授

秦成勇教授

任粉玉教授

任建林教授

邵先玉教授

沈琳主任医师

沈薇教授

施瑞华教授

宋军副教授

唐世刚教授

田宇彬教授

度必光教授

宛新建副教授

王邦茂教授

王炳元教授

王承党教授

王江滨教授

王俊平教授

王蔚虹教授

王晓艳副教授

夏冰教授

夏时海副教授

徐灿霞教授

徐可树教授

杨建民教授

张国主任医师

姚树坤教授

张国梁主任医师

张军教授

张庆瑜教授

张小晋主任医师

张筱茵副教授

张志坚教授

郑培永教授

郑鹏远教授

郑素军副主任医师

郑勇教授

周国雄主任医师

周宇教授

邹晓平主任医师

诸琦教授

于珮主任医师

#### 消化外科学

白雪副主任医师

白雪巍副主任医师

白玉作教授

蔡开琳副教授

蔡三军主任医师

曹杰主任医师

陈炳官教授

陈光教授

陈海龙教授

陈积圣教授

陈进宏副主任医师

陈凇教授

陈汝福教授

陈亚军主任医师

陈钟教授

程爱国教授

程树群副教授

崔云甫教授

戴朝六教授

戴冬秋教授

丁义涛教授

杜顺达副教授

房林教授

傅红副教授

傅华群教授

傅思源副教授

傅晓辉副教授

傅志仁主任医师

高毅主任医师

葛海燕教授

巩鹏副教授

谷俊朝主任医师

顾国利副主任医师

顾岩教授

韩天权教授

郝纯毅主任医师

郝立强副教授

何超教授

何向辉教授

何晓顺教授

何裕隆教授

胡安斌副教授

黄志勇教授

季加孚教授

姜卫东教授

姜波健教授

孔静任医师

黎乐群教授

李革副教授

李国威教授

李华副教授

李华山主任医师

李升平教授

李胜研究员

李涛副主任医师

李文岗教授

李小荣教授

李旭副教授

李永翔教授

李正荣副教授

李志霞教授

李宗芳教授

梁力建教授

刘宝林教授

刘超教授

刘宏鸣副教授

刘建教授

刘亮副主任医师

刘颖斌主任医师

卢军华教授

陆云飞教授

禄韶英副教授

吕凌副教授

吕云福教授

麻勇副研究员

齐清会教授

秦春宏副主任医师

秦华东教授

秦环龙教授

秦建民主任医师

邱伟华主任医师

仇毓东教授

崔清波副教授

单云峰副主任医师

沈柏用副教授

施宝民教授

施诚仁教授

施晓雷副主任医师

石毓君副研究员

宋新明教授

宋振顺教授

孙诚谊教授

孙文兵教授

孙星副教授

孙学英教授

邵升副教授

谭晓冬教授

汤朝晖副主任医师

汤绍涛教授

唐南洪教授

田晓峰教授

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

### 消化感染病学

白浪副教授  
陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈志辉副主任医师

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

### 消化中医药学

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

邢建峰副教授  
徐列明教授  
许玲教授  
徐庆教授  
袁红霞研究员  
张声生教授

### 消化肿瘤学

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

### 消化影像学

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

### 消化内镜及介入治疗学

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

余日胜主任医师  
袁友红副教授  
张火俊副教授

### 消化中西医结合学

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

### 消化基础研究

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

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

### 消化病理学

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



# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2013年3月28日 第21卷 第9期 (总第413期)

## 基础研究

- 739 Nrf2在肝纤维化小鼠肝细胞中的核转移  
吴硕, 马兴彬, 周成军, 赵敬杰, 郭建强, 许伟华
- 745 健脾清热活血方介导Wnt/ $\beta$ -catenin通路对人结肠SW480细胞的影响  
张保静, 张涛, 陈远能, 王小平, 潘怀耿
- 754 下调paxillin高表达对结直肠癌细胞SW480细胞信号转导及超微结构的影响  
郑建伟, 尹洪芳, 汪欣, 刘玉村, 万远廉, 朱静

## 临床研究

- 761 启动子区甲基化对肝细胞癌锌指蛋白331表达的调控  
杨志华, 郭明洲, 李鑫, 毛高平

## 文献综述

- 766 维生素D与非酒精性脂肪性肝病关系的研究进展  
朴熙绪, 韩红梅
- 773 PDGF及其受体与肝纤维化的相关性  
黄雯, 朱莹
- 779 肠道菌群参与结直肠癌发生的模式  
贾盛佼, 王莉莉, 于新娟, 董开蕊, 田宇彬, 董全江
- 785 功能性消化不良的发病机制  
全甲钊, 曲波, 王蓓蓓, 白梅

## 研究快报

- 791 管腔内局部照射诱发急性放射性食管损伤动物模型的构建及其应用  
全甲钊, 曲波, 王耀明, 金世柱, 崔亚利, 辛然, 王蓓蓓, 姜海燕
- 798 厄贝沙坦对糖尿病胃轻瘫大鼠ET-1和AT1R表达的影响  
何莉莉, 朱雅娜, 任荣, 张玉, 王飞, 李媛, 张艺凡, 孙玉凤
- 804  $\alpha$ -亚麻酸对转化生长因子 $\beta$ 1诱导的肝星状细胞的影响  
王莉娟, 吴金明, 方红龙, 刘扬, 黄智铭
- 809 SCF/c-Kit信号通路在“泻剂结肠”发病机制中的作用  
霍明东, 丁曙晴, 丁义江, 江滨, 张波

## 临床经验

- 814 重组腺相关病毒介导的RNA干扰对乙型肝炎病毒复制和表达的影响  
付冰峰, 李绍祥, 宁守斌
- 820 以肝病症状为首表现的肝豆状核变性93例  
林连捷, 王东旭, 郑长青, 曹男, 丁楠楠
- 824 自身免疫性胰腺炎7例  
杨珣, 姜沫含, 孙明军
- 829 KAP-1在胰腺癌中的表达及临床意义  
江建新, 詹磊, 黄洋, 何燕浙, 孙诚谊
- 835 EphA3在结肠癌组织中的表达及临床意义  
于泳, 窦科峰, 王家林, 李霄, 王建锋, 韩炜, 张卓超, 阮柏, 王德盛
- 840 地衣芽孢杆菌联合PPI三联疗法根除幽门螺杆菌的临床疗效  
蒋永爱, 欧希龙, 王建宁



附 录	I - V 《世界华人消化杂志》投稿须知 I 2013年国内国际会议预告
志 谢	I 志谢世界华人消化杂志编委
消 息	744 《世界华人消化杂志》正文要求 753 中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》影响因子0.873 784 2012年度《世界华人消化杂志》发文情况 797 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.775 808 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版) 813 《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号 819 《世界华人消化杂志》栏目设置 823 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 828 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 834 《世界华人消化杂志》参考文献要求 844 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
封面故事	全甲钊, 曲波, 王耀明, 金世柱, 崔亚利, 辛然, 王蓓蓓, 姜海燕. 管腔内局部照射诱发急性放射性食管损伤动物模型的构建及其应用. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 791-797 URL: <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/791.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/791.asp</a> DOI: <a href="http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.791">http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.791</a>
本期责任人	编务 马帅; 送审编辑 鲁亚静, 闫晋利; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 黄新珍; 形式规范 审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核编辑部主任 刘谦

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名  
(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2013-03-28

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

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

主编

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

编辑部

李军亮, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号,

远洋国际中心D座903室

电话: 010-59080035

传真: 010-85381893

E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Co., Limited

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

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

制作

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号,

远洋国际中心D座903室

电话: 010-85381892

传真: 010-85381893

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

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

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

特别声明

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

定价

每期68.00元 全年36期2448.00元

© 2013年版权归Baishideng所有

# World Chinese Journal of Digestology

## March 2013 Contents in Brief Volume 21 Number 9

<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>739 Nuclear translocation of Nrf2 in hepatocytes of mice with hepatic fibrosis <i>Wu S, Ma XB, Zhou CJ, Zhao JJ, Guo JQ, Xu WH</i></p> <p>745 Treatment with Jian-pi-qing-re-huo-xue detection regulates SW480 cell apoptosis by altering Wnt/<math>\beta</math>-catenin expression <i>Zhang BJ, Zhang T, Chen YN, Wang XP, Pan HG</i></p> <p>754 SiRNA-mediated silencing of paxillin down-regulates ERK1/2 signaling and alters cell ultrastructure in colorectal carcinoma cell line SW480 <i>Zheng JW, Yin HF, Wang X, Liu YC, Wan YL, Zhu J</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	<p>761 Zinc-finger protein 331 expression is regulated by promoter region hypermethylation in hepatocellular carcinoma <i>Yang ZH, Guo MZ, Li X, Mao GP</i></p>
<b>REVIEW</b>	<p>766 Relationship between vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease <i>Piao XX, Han HM</i></p> <p>773 Correlation between PDGFs and their receptor and liver fibrosis <i>Huang W, Zhu X</i></p> <p>779 Mechanisms underlying the role of intestinal microbiota in pathogenesis of colorectal cancer <i>Jia SJ, Wang LL, Yu XJ, Dong KX, Tian ZB, Dong QJ</i></p> <p>785 Pathogenesis of functional dyspepsia <i>Tong JZ, Qu B, Wang BB, Bai M</i></p>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>791 Development of a rat model of intraluminal local radiation-induced acute radioactive esophageal injury <i>Tong JZ, Qu B, Wang YM, Jin SZ, Cui YL, Xin R, Wang BB, Jiang HY</i></p> <p>798 Effect of irbesartan on expression of ET-1 and AT1R in gastric tissues of diabetic rats with gastroparesis <i>He LL, Zhu YN, Ren R, Zhang Y, Wang F, Li Y, Zhang YF, Sun YF</i></p> <p>804 Effect of LNA treatment on cell proliferation, secretion of types I and III collagen, and <math>\alpha</math>-SMA expression in rat hepatic satellite cells treated with transforming growth factor <math>\beta</math>1 <i>Wang LJ, Wu JM, Fang HL, Liu Y, Huang ZM</i></p> <p>809 Role of SCF/c-Kit signaling pathway in the pathogenesis of cathartic colon <i>Huo MD, Ding SQ, Ding YJ, Jiang B, Zhang B</i></p>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>814 Effect of recombinant adenovirus-associated virus-mediated RNA interference on HBV replication and expression <i>Fu BF, Li SX, Ning SB</i></p> <p>820 Wilson's disease with hepatic manifestations as the first presentation: An analysis of 93 cases <i>Lin LJ, Wang DX, Zheng CQ, Cao N, Ding NN</i></p> <p>824 Clinical characteristics of autoimmune pancreatitis: An analysis of 7 cases <i>Yang Y, Jiang MH, Sun MJ</i></p> <p>829 Clinical significance of expression of KAP-1 in pancreatic carcinoma <i>Jiang JX, Zhan L, Huang Y, He YZ, Sun CY</i></p> <p>835 Clinical significance of expression of EphA3 in colon cancer <i>Yu Y, Dou KF, Wang JL, Li X, Wang JF, Han W, Zhang ZC, Ruan B, Wang DS</i></p> <p>840 Efficacy of <i>Bacillus licheniformis</i> combined with PPI triple therapy in eradication of <i>Helicobacter pylori</i> <i>Jiang YA, Ou XL, Wang JN</i></p>

<b>APPENDIX</b>	I – V Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> I Meeting events calendar in 2013
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	I Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
<b>COVER</b>	<i>Tong JZ, Qu B, Wang YM, Jin SZ, Cui YL, Xin R, Wang BB, Jiang HY.</i> Development of a rat model of intraluminal local radiation-induced acute radioactive esophageal injury. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2013; 21(9): 791-797 URL: <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/791.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/791.asp</a> DOI: <a href="http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.797">http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.797</a>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	Assistant Editor: <i>Shuai Ma</i> Review Editor: <i>Ya-Jing Lu, Jin-Li Yan</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Xin-Zhen Huang</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Qian Liu</i>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993

**Renamed** on January 25, 1998

**Publication date** March 28, 2013

### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

### ISSN

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

### EDITOR-IN-CHIEF

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

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

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

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

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

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

**Da-Lie Ma, Professor**, Department of Pathology,

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

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

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

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

### EDITORIAL OFFICE

Jun-Liang Li, Director

*World Chinese Journal of Digestology*

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

Fax: +86-10-85381893

E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

### PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Flat C, 23/F., Lucky Plaza,

315-321 Lockhart Road, Wan Chai,

Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

E-mail: [bpg@baishideng.com](mailto:bpg@baishideng.com)

<http://www.wjgnet.com>

### PRODUCTION CENTER

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

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

### PRINT SUBSCRIPTION

RMB 68 Yuan for each issue

RMB 2448 Yuan for one year

### COPYRIGHT

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

### SPECIAL STATEMENT

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

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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



# Nrf2在肝纤维化小鼠肝细胞中的核转移

吴硕, 马兴彬, 周成军, 赵敬杰, 郭建强, 许伟华

吴硕, 马兴彬, 郭建强, 许伟华, 山东大学第二医院消化内科  
山东省济南市 250033

周成军, 山东大学第二医院病理科 山东省济南市 250033

赵敬杰, 山东大学第二医院临床分子生物学实验室 山东省  
济南市 250033

吴硕, 在读研究生, 主要从事肝纤维化的研究。

百肝肝纤维化基础研究基金资助项目, No. 2010-008

作者贡献分布: 此课题由许伟华设计; 动物模型制作由吴硕与马  
兴彬完成; 蛋白检测分析由吴硕、郭建强及赵敬杰操作完成; 病  
理分析由吴硕与周成军完成; 论文写作由吴硕完成。

通讯作者: 许伟华, 主任医师, 250033, 山东省济南市天桥区247  
号, 山东大学第二医院消化内科. xu30002001@yahoo.com.cn

电话: 0531-85875454

收稿日期: 2013-02-03 修回日期: 2013-03-05

接受日期: 2013-03-06 在线出版日期: 2013-03-28

## Nuclear translocation of Nrf2 in hepatocytes of mice with hepatic fibrosis

Shuo Wu, Xing-Bin Ma, Cheng-Jun Zhou,  
Jing-Jie Zhao, Jian-Qiang Guo, Wei-Hua Xu

Shuo Wu, Xing-Bin Ma, Jian-Qiang Guo, Wei-Hua Xu,  
Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Shan-  
dong University, Jinan 250033, Shandong Province, China

Cheng-Jun Zhou, Department of Pathology, the Second  
Hospital of Shandong University, Jinan 250033, Shandong  
Province, China

Jing-Jie Zhao, Laboratory of Clinical Molecular Biology,  
the Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033,  
Shandong Province, China

Supported by: the Liver Fibrosis Basic Research Founda-  
tion of Pearl Ocean Pharmaceutical Holdings Limited, No.  
2010-008

Correspondence to: Wei-Hua Xu, Chief Physician,  
Department of Gastroenterology, the Second Hospital of  
Shandong University, 247 Tianqiao District, Jinan 250033,  
Shandong Province, China. xu30002001@yahoo.com.cn

Received: 2013-02-03 Revised: 2013-03-05

Accepted: 2013-03-06 Published online: 2013-03-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the nuclear translocation of  
NF-E2-related factor 2 (Nrf2) in hepatocytes of  
mice with hepatic fibrosis.

**METHODS:** Mice were randomly divided into  
two groups: normal control group and model  
group. For the model group, carbon tetrachlo-  
ride (CCl<sub>4</sub>) dissolved in mineral oil was injected  
intraperitoneally for 10 weeks, while the nor-  
mal control group was injected with the same

volume of mineral oil. At the end of the 10th  
week, specimens were collected to assess the  
degrees of hepatic fibrosis and inflammation by  
haematoxylin-eosin staining and Masson stain-  
ing. Western blot was used to detect the protein  
expression of Nrf2 and NAD(P)H quinine oxido-  
reductase 1 (Nqo1) and nuclear translocation of  
Nrf2.

**RESULTS:** Compared to the normal control  
group, the degrees of hepatic inflammation and  
fibrosis in the model group were significantly  
increased. Western blot analysis showed that,  
compared to the normal control group ( $0.490 \pm$   
 $0.088$ ,  $0.430 \pm 0.057$ ,  $0.370 \pm 0.022$ ), the expres-  
sion levels of Nrf2 and Nqo1 proteins, as well  
as nuclear translocation of Nrf2 were increased  
significantly in the model group ( $0.490 \pm 0.088$  vs  
 $0.790 \pm 0.045$ ,  $0.430 \pm 0.057$  vs  $0.720 \pm 0.040$ ,  $0.370$   
 $\pm 0.022$  vs  $0.670 \pm 0.044$ ;  $F = 2.027$ ,  $0.772$ ,  $1.552$ , all  
 $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** In mice with hepatic fibrosis,  
the nuclear translocation of Nrf2 in hepatocytes  
is increased to up-regulate its target protein  
Nqo1.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** NF-E2-related factor 2; NAD(P)H qui-  
nine oxidoreductase 1; Liver fibrosis

Wu S, Ma XB, Zhou CJ, Zhao JJ, Guo JQ, Xu WH. Nuclear  
translocation of Nrf2 in hepatocytes of mice with hepatic  
fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(9): 739-744  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/739.asp> DOI:  
<http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.739>

## 摘要

**目的:** 研究肝纤维化小鼠肝细胞中核因子相  
关因子-2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)核转移  
情况。

**方法:** 实验小鼠随机分为正常对照组(normal  
control, NC组)、模型组, 每组8只。模型组腹  
腔注射四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)石蜡油溶液建造肝纤  
维化模型, NC组给予同体积矿物油腹腔注射,

## ■背景资料

慢性肝损伤, 如乙  
型和/或丙型病毒  
性肝炎、非酒精  
性脂肪肝、自身  
免疫性肝病等在  
全球的发病率逐  
年升高, 其引起  
的肝纤维化病变  
是向终末期肝硬  
化病变发展的病  
理基础。CCl<sub>4</sub>注射  
是建立肝纤维化  
模型的经典方法,  
其代谢产物具有  
肝毒性, 能够引起  
线粒体损伤、肝  
细胞坏死等加剧  
氧化应激损伤, 释  
放大量炎性及纤  
维化细胞因子而  
导致肝纤维化发  
生。

## ■同行评议者

鲁玉辉, 副教授,  
福建中医药大学  
中医学院; 党双  
锁, 教授, 西安交  
通大学医学院第  
二附属医院感染  
科

## ■研究前沿

Keap1-Nrf2-ARE通路等多种药物对肝脏治疗的作用密切相关,适当的药物干预可以通过促进Keap1-Nrf2-ARE通路激活因子表达从而提高药物的肝脏保护作用。

共10 wk. 收集肝脏标本HE染色及Masson染色观察肝脏炎症和纤维化程度; Western blot检测细胞内Nrf2、醌氧化还原酶1(quinone oxidoreductase, Nqo1)总蛋白及Nrf2核蛋白表达情况。

**结果:** 随CCl<sub>4</sub>肝损伤时间延长, 组织病理学结果显示模型组明显炎症反应及纤维间隔形成; Western blot结果显示, 与NC组Nrf2、Nqo1总蛋白及Nrf2核蛋白表达量分别为 $0.490 \pm 0.088$ 、 $0.430 \pm 0.057$ 、 $0.370 \pm 0.022$ 比较, 模型组为 $0.790 \pm 0.045$ 、 $0.720 \pm 0.040$ 、 $0.670 \pm 0.044$ 显著增高, 差异具有统计学意义( $F = 2.027$ 、 $0.772$ 、 $1.552$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 肝纤维化小鼠肝细胞中Nrf2核转移增多并上调细胞保护性蛋白Nqo1表达。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 核因子相关因子-2; 醌氧化还原酶1; 肝纤维化

吴硕, 马兴彬, 周成军, 赵敬杰, 郭建强, 许伟华. Nrf2在肝纤维化小鼠肝细胞中的核转移. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 739-744 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/739.asp>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.739>

## 0 引言

慢性肝病损伤致肝脏自身组织免疫系统激活, 进行连续性修复反应过程是肝纤维化的共同通路. 肝纤维化演变过程中受损的肝细胞、炎症细胞和Kupffer细胞释放活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)及多种细胞因子如肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素6(interleukin-6, IL-6), 通过旁分泌方式促进肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化增殖<sup>[1]</sup>, 而HSCs活化并释放ROS形成持续恶化的病理微环境. 核因子相关因子2(NF-E2-related factor 2, Nrf2)属于CNC(Cap 'n' Collar)家族, 具有高度保守的碱性亮氨酸拉链bZIP结构. 生理状态下, 细胞浆内Nrf2与Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)结合, 在氧化应激和亲电子物质刺激下, Nrf2与Keap1解耦联并转入胞核内, 与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合并转录一系列目标基因, 如醌氧化还原酶1(quinone oxidoreductase, Nqo1)表达, 发挥其抗氧化损伤、解毒、抑制化学致癌等作用. 本实验拟在观察肝纤维化时Nrf2

表达及核转移情况, 为探讨肝脏疾病预防及治疗提供方向。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 清洁级健康♀昆明小鼠16只, 6周龄, 体重 $26 \pm 5$  g, 由山东大学实验动物中心提供. CCl<sub>4</sub>(分析纯品)和矿物油购自中国医药集团济南凯琪生物技术有限公司. Nrf2抗体(ab31163)、Nqo1抗体(ab34173m)购自英国Abcam公司; 碱性磷酸酶标记的二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 总蛋白提取试剂盒、胞核蛋白提取试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物科技公司; ECL发光试剂盒购自美国Millipore公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组与模型制备:** 实验小鼠16只, 适应性饲养1 wk, 随机分为正常对照组(normal control, NC组)( $n = 8$ )、模型组( $n = 8$ ). NC组给予同体积矿物油腹腔注射, 模型组腹腔注射石蜡油稀释的CCl<sub>4</sub>溶液(体积比1:10)0.25 mg/g, 1次/3 d, 共10 wk. 禁食不禁水12 h后称体质量, 水合氯醛0.3 mL/100 g麻醉, 摘取部分肝脏固定于10%甲醛, 剩余肝组织液氮冰冻后存于-80 °C。

**1.2.2 肝组织病理学检测:** 肝组织标本经10%甲醛固定, 石蜡包埋, 切片机(RM2235型, 德国莱卡)4  $\mu$ m厚连续切片, 二甲苯透明、梯度酒精水化后, 分别行HE染色、Masson染色, 显微镜(DM520型, 德国莱卡)下观察肝炎症状及纤维化病变。

**1.2.3 Western blot检测细胞内Nrf2的蛋白表达量、核转移情况及Nqo1蛋白表达水平:** 按照说明书操作分别提取总蛋白及核蛋白后, BCA法蛋白定量. 取等量蛋白质样品体积1:6加入适量Loading buffer, 于100 °C水浴变性5 min, 通过10%SDS-PAGE电泳分离蛋白质后电转移法转移蛋白至NC膜上, 5%脱脂奶粉封闭1.5 h, 加入一抗(Nrf2、Nqo1、 $\beta$ -actin、GAPDH, 浓度为1:1 000)4 °C过夜; 次日碱性磷酸酶标记的二抗(浓度为1:5 000)孵育2 h, ECL显影液曝光显影. Quantity One图像分析系统测定每条带的灰度值进行分析, 用 $\beta$ -actin、GAPDH作为内参, 以相对灰度值进行统计学分析。

**统计学处理** 实验数据以mean $\pm$ SD表示, 组间比较采用 $t$ 检验, 所有数据采用SPSS13.0软件包分析,  $P < 0.05$ 为差异统计学意义有显著性差异。



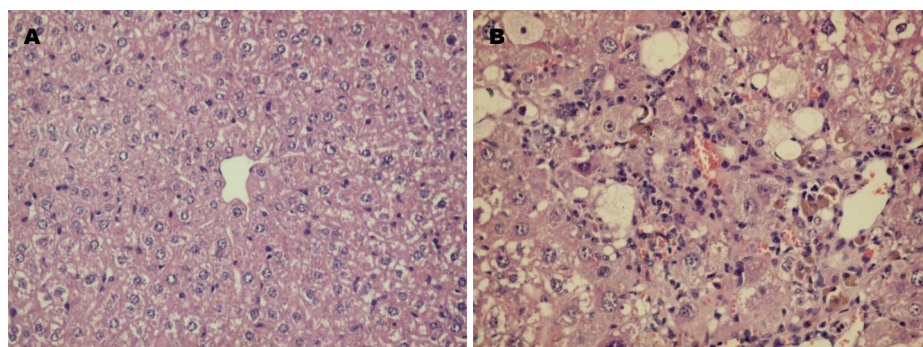


图1 各组肝组织形态学改变(HE × 200). A: NC组; B: 模型组.

#### ■ 相关报道

Vasiliou等从肝硬化小鼠肝脏中分离出HSCs, 检测出HSCs中Nqo1的表达量明显增多, 而Nqo1主要受控于Nrf2的调节, 因此Nrf2通过Nqo1发挥其抗肝纤维化作用.

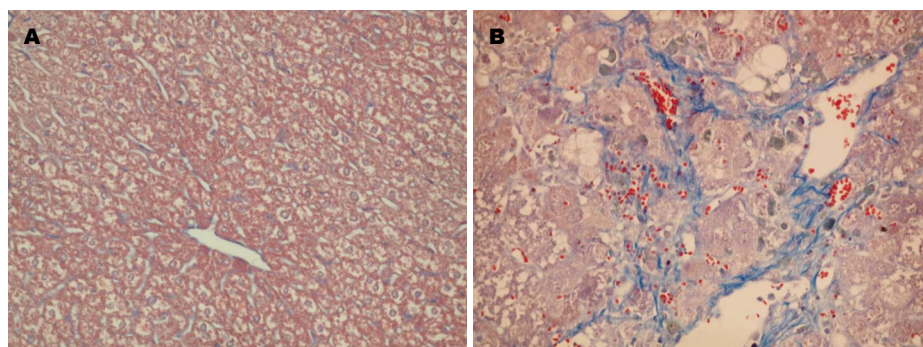


图2 各组肝组织形态学改变(Masson染色 × 100). A: NC组; B: 模型组.

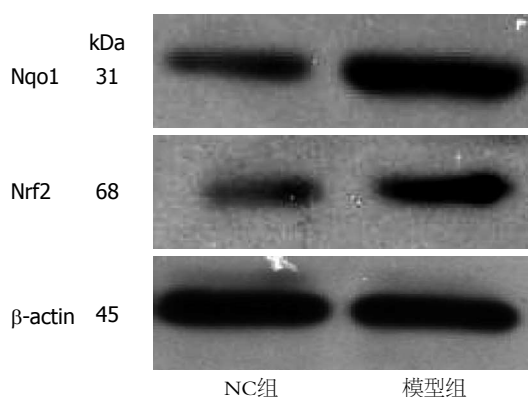


图3 各组肝组织中Nrf2、Nqo1总蛋白表达量的变化. Nrf2: 核因子相关因子; Nqo1: 醌氧化还原酶1.

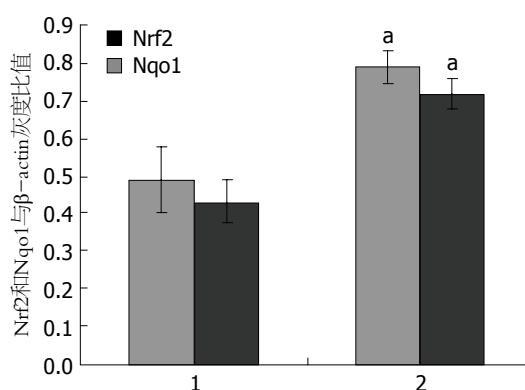


图4 各组肝组织中Nrf2、Nqo1总蛋白与β-actin灰度比值. 1: NC组; 2: 模型组. <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NC组. Nrf2: 核因子相关因子; Nqo1: 醌氧化还原酶1.

## 2 结果

**2.1 一般情况的观察** NC组小鼠体质量逐渐增加, 性情温和, 毛发顺滑; 模型组小鼠毛发干枯, 易激惹, 活动减少, 食量降低, 体质量较前减轻. 实验过程中, 模型组小鼠死亡2只, 死亡原因为CCl<sub>4</sub>毒性导致肝脏大面积坏死致肝功能衰竭, 其余小鼠均进入结果分析.

**2.2 肝脏组织炎症及纤维化程度比较** NC组肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列, 小叶结构清晰, 未见明显炎性细胞浸润及胶原纤维沉积; 模型组弥漫的炎性细胞及脂肪变肝细胞浸润, 小叶结构严重破坏, 肝板破坏及中央静脉坍塌, 视野内广泛致密蓝染纤维间隔形成(图1, 2).

**2.3 肝脏组织Nrf2、Nqo1总蛋白及Nrf2核蛋白**

**表达情况** 模型组Nrf2总蛋白表达量为 $0.790 \pm 0.045$ 较NC组 $0.490 \pm 0.088$ 显著增多, 差异具有统计学意义( $F = 2.027, t = 6.101, P < 0.05$ ). 模型组Nqo1总蛋白表达量为 $0.720 \pm 0.040$ 与NC组为 $0.430 \pm 0.057$ 相比明显增多, 具有统计学差异( $F = 0.772, t = 8.067, P < 0.05$ ). 模型组Nrf2核蛋白表达量为 $0.670 \pm 0.044$ 较NC组 $0.370 \pm 0.022$ 明显增多, 差异具有统计学意义( $F = 1.552, t = 11.871, P < 0.05$ , 图3-6).

## 3 讨论

随着世界范围发病率逐渐增加的慢性肝损伤, 如乙型和/或丙型病毒性肝炎、非酒精性脂肪肝、自身免疫性肝病等引起的肝纤维化病变是



## ■应用要点

本实验结果显示, 与NC组对比, 随着CCl<sub>4</sub>肝损伤时间延长小鼠一般情况渐差, 模型组通过持续10 wk腹腔注射矿物油稀释CCl<sub>4</sub>成功建立小鼠肝纤维化模型。

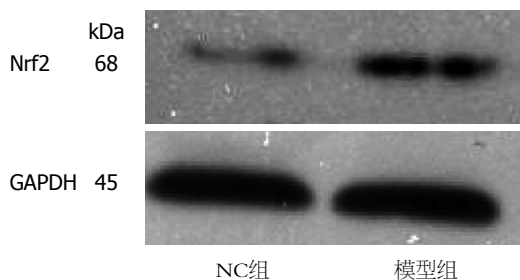


图5 各组肝组织中Nrf2核蛋白表达量变化。Nrf2: 核因子相关因子。

向终末期肝硬化病变发展的病理基础。CCl<sub>4</sub>注射是建立肝纤维化模型的经典方法, 其代谢产物也具有肝毒性, 引起线粒体损伤、肝细胞坏死等加剧氧化应激损伤, 释放大炎症及纤维化细胞因子而导致肝纤维化发生<sup>[2]</sup>。肝脏细胞是产生ROS的重要场所, 尤其当CCl<sub>4</sub>在内质网微粒体内生物转化过程产生大量ROS, 引起氧化应激、脂质过氧化损伤直接或间接加重肝细胞凋亡、炎症坏死、纤维化病变<sup>[3]</sup>。本实验结果显示, 与NC组对比, 随着CCl<sub>4</sub>肝损伤时间延长小鼠一般情况渐差, 模型组通过持续10 wk腹腔注射矿物油稀释CCl<sub>4</sub>成功建立小鼠肝纤维化模型。

Nrf2转录因子通过清除机体细胞内外环境的氧化物质及亲电子物质, 抵抗氧化应激损害, 维持机体细胞的氧化还原稳态<sup>[4]</sup>, 他几乎存在于各种细胞中<sup>[5]</sup>, 属于具有高度保守的碱性亮氨酸拉链bZIP结构的CNC家族, 对机体细胞生存进行多向调节<sup>[6]</sup>。静息状态下, Nrf2与胞浆蛋白伴侣分子Keap1蛋白结合<sup>[7]</sup>, 存在于细胞浆内, 处于活性相对抑制状态, 维持在低水平表达。当细胞内ROS增多或氧化应激发生时, Keap1的半胱氨酸功能亚基被修饰后与Nrf2解耦联<sup>[8]</sup>, Nrf2胞核内转移增多, 其稳定性增高<sup>[9]</sup>, 形成Maf-Nrf2二聚体与ARE结合后转录性调节其下游靶基因<sup>[10]</sup>, 即促进肝内细胞II相解毒酶和抗氧化酶基因的表达, 如Nqo1、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽S转移酶等发挥抗氧化应激、减轻肝脏炎症、抗肝细胞凋亡、降低胰岛素抵抗<sup>[11-13]</sup>等作用。Nrf2-ARE通路的激活也可抑制Keap1蛋白介导的Nrf2泛素化降解<sup>[14]</sup>, 解除对Nrf2表达的抑制作用, 进一步促进ARE启动子下游保护性基因的表达<sup>[15]</sup>。Keap1对Nrf2的细胞核内转移及转出均有调节作用, 其调节Nrf2的细胞核转移依赖输入蛋白α7与Keap1羧基端Kelch结构域的相互作用; 同时Keap1还具有强大的Nrf2核转出信号,

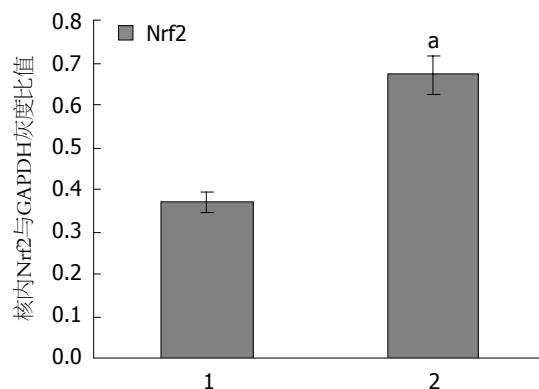


图6 各组肝组织中Nrf2核蛋白与GAPDH灰度比值。1: NC组; 2: 模型组。\* $P < 0.05$  vs NC组。Nrf2: 核因子相关因子。

促进Nrf2-Keap1复合体输出胞核, 从而保持Nrf2活性剂ARE依赖性基因的有序表达<sup>[16]</sup>。Keap1介导的Nrf2降解对维持细胞的正常生理功能具有重要作用, 实验研究发现Keap1基因敲除小鼠Nrf2靶基因高水平表达, 却因角化过度于围产期死亡, 而Keap1、Nrf2基因均缺失的基因突变情况下上述现象被抑制<sup>[17]</sup>。另外, 转录因子Nrf2也可通过与自身基因的ARE区域结合调节其自身活性<sup>[18]</sup>。研究发现Nrf2基因敲除小鼠对CCl<sub>4</sub>所致肝损伤的修复明显延迟, Nrf2敲除小鼠肝纤维化及炎症明显加重, 这是由于肝细胞目标基因Nrf2及其编码酶的减少, 导致肝细胞对CCl<sub>4</sub>和其代谢产物的解毒作用减弱<sup>[19]</sup>, 其对药物及金属毒性引起的肝损害更敏感<sup>[4]</sup>。本实验Western blot证实模型组较NC组Nrf2总蛋白表达及核转移显著增多, 说明发生Nrf2在肝脏纤维化病变条件下不仅上调自身蛋白表达, 还促进其核内转移显著增加从而发挥生物学功能。

Nrf2肝保护机制之一通过促进Nqo1表达实现, Nqo1是细胞基质内的黄素蛋白, 主要发挥氧化还原、解毒代谢作用, 如催化双电子物质还原反应, 通过清除醌类及其衍生物等有害物质, 抵抗自由基、ROS及氧化应激等损伤所致的细胞损害<sup>[20]</sup>。Itoh等<sup>[21]</sup>研究发现Nrf2基因敲除小鼠Nqo1表达显著降低, 说明Nqo1主要受控于Nrf2的调节, Nrf2通过结合于Nqo1基因的ARE序列, 上调Nqo1蛋白的表达, Vasiliou等<sup>[22]</sup>从肝硬化的小鼠肝脏中分离HSCs, 检测出HSCs中Nqo1表达明显增多, 而Nqo1主要受控于Nrf2的调节, 因此Nrf2通过Nqo1来发挥其抗肝纤维作用。本实验结果显示模型组Nqo1蛋白水平明显高于NC组, 提示肝纤维化条件下Nrf2增加自身表达及核内转移, 从而通过Nrf2-ARE通路上调保护性基因

Nqo1表达, 进一步发挥抵抗肝损伤功能。

Keap1-Nrf2-ARE通路与多种药物对肝脏治疗作用都有着密切联系, 适当的药物干预可以通过促进Keap1-Nrf2-ARE通路激活因子表达从而提高药物的肝脏保护作用<sup>[23-26]</sup>。本实验研究证实随着小鼠肝脏经腹腔注射CCl<sub>4</sub>时间延长, 肝脏纤维化病变持续进展, 肝细胞通过促进Nrf2核内转移, 上调细胞保护性基因Nqo1表达, 从而抵抗慢性肝损伤病理微环境中自由基、ROS及氧化应激等损伤所致的细胞损伤, 起到肝脏保护作用。因此, 通过药物激活Nrf2并促进其核转移是治疗肝脏纤维化的新方向, 而同时Keap1严格调控Nrf2胞核内表达, 从而避免药物促进作用下Nrf2过量表达及核内转移导致细胞损伤的相关机制仍需进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 Calvaruso V, Maimone S, Gatt A, Tuddenham E, Thursz M, Pinzani M, Burroughs AK. Coagulation and fibrosis in chronic liver disease. *Gut* 2008; 57: 1722-1727 [PMID: 19022928 DOI: 10.1136/gut.2008.150748]
- 2 Williams AT, Burk RF. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 279-284 [PMID: 2281335 DOI: 10.1055/s-2008-1040483]
- 3 Bedossa P, Houghlum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen alpha 1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? *Hepatology* 1994; 19: 1262-1271 [PMID: 8175151]
- 4 Ma Q. Xenobiotic-activated receptors: from transcription to drug metabolism to disease. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 1651-1671 [PMID: 18707139 DOI: 10.1021/tx800156s]
- 5 Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 9926-9930 [PMID: 7937919 DOI: 10.1073/pnas.91.21.9926]
- 6 Owuor ED, Kong AN. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 765-770 [PMID: 12213568 DOI: 10.1016/S0006-2952(02)01137-1]
- 7 Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 1999; 13: 76-86 [PMID: 9887101 DOI: 10.1101/gad.13.1.76]
- 8 Itoh K, Mimura J, Yamamoto M. Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13: 1665-1678 [PMID: 20446768 DOI: 10.1089/ars.2010.3222]
- 9 Motohashi H, Katsuoka F, Engel JD, Yamamoto M. Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 6379-6384 [PMID: 15087497 DOI: 10.1073/pnas.0305902101]
- 10 Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *J Biol Chem* 1991; 266: 11632-11639 [PMID: 1646813]
- 11 Tanito M, Agbaga MP, Anderson RE. Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 1838-1850 [PMID: 17512463 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.018]
- 12 Beyer TA, Werner S. The cytoprotective Nrf2 transcription factor controls insulin receptor signaling in the regenerating liver. *Cell Cycle* 2008; 7: 874-878 [PMID: 18414027 DOI: 10.4161/cc.7.7.5617]
- 13 Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem* 2003; 278: 2396-2402 [PMID: 12441344 DOI: 10.1074/jbc.M209195200]
- 14 Nguyen T, Sherratt PJ, Huang HC, Yang CS, Pickett CB. Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 2003; 278: 4536-4541 [PMID: 12446695 DOI: 10.1074/jbc.M207293200]
- 15 Nguyen T, Yang CS, Pickett CB. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 433-441 [PMID: 15256215 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.033]
- 16 Sun Z, Wu T, Zhao F, Lau A, Birch CM, Zhang DD. KPNA6 (Importin {alpha}7)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 1800-1811 [PMID: 21383067 DOI: 10.1128/MCB.05036-11]
- 17 Wakabayashi N, Itoh K, Wakabayashi J, Motohashi H, Noda S, Takahashi S, Imakado S, Kotsuji T, Otsuka F, Roop DR, Harada T, Engel JD, Yamamoto M. Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat Genet* 2003; 35: 238-245 [PMID: 14517554 DOI: 10.1038/ng1248]
- 18 Xu W, Hellerbrand C, Köhler UA, Bugnon P, Kan YW, Werner S, Beyer TA. The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Lab Invest* 2008; 88: 1068-1078 [PMID: 18679376 DOI: 10.1038/labinvest.2008.75]
- 19 Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 89-116 [PMID: 16968214 DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046]
- 20 Aleksunes LM, Goedken M, Manautou JE. Upregulation of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 during human liver injury. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1937-1940 [PMID: 16610002]
- 21 Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 313-322 [PMID: 9240432 DOI: 10.1006/bbrc.1997.6943]

#### ■同行评价

本文设计合理, 内容具有一定意义。

- 22 Vasiliou V, Qamar L, Pappa A, Sophos NA, Petersen DR. Involvement of the electrophile responsive element and p53 in the activation of hepatic stellate cells as a response to electrophile menadione. *Arch Biochem Biophys* 2003; 413: 164-171 [PMID: 12729613 DOI: 10.1016/S0003-9861(03)00095-X]
- 23 Zhao HD, Zhang F, Shen G, Li YB, Li YH, Jing HR, Ma LF, Yao JH, Tian XF. Sulforaphane protects liver injury induced by intestinal ischemia reperfusion through Nrf2-ARE pathway. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3002-3010 [PMID: 20572303 DOI: 10.3748/wjg.v16.i24.3002]
- 24 Choi HK, Pokharel YR, Lim SC, Han HK, Ryu CS, Kim SK, Kwak MK, Kang KW. Inhibition of liver fibrosis by solubilized coenzyme Q10: Role of Nrf2 activation in inhibiting transforming growth factor-beta1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 240: 377-384 [PMID: 19647758 DOI: 10.1016/j.taap.2009.07.030]
- 25 Lee HS, Li L, Kim HK, Bilehal D, Li W, Lee DS, Kim YH. The protective effects of Curcuma longa Linn. extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats via upregulation of Nrf2. *J Microbiol Biotechnol* 2010; 20: 1331-1338 [PMID: 20890099 DOI: 10.4014/jmb.1002.03010]
- 26 Yates MS, Kwak MK, Egner PA, Groopman JD, Boddreddigari S, Sutter TR, Baumgartner KJ, Roebuck BD, Liby KT, Yore MM, Honda T, Gribble GW, Sporn MB, Kensler TW. Potent protection against aflatoxin-induced tumorigenesis through induction of Nrf2-regulated pathways by the triterpenoid 1-[2-cyano-3-,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oyl]imidazole. *Cancer Res* 2006; 66: 2488-2494 [PMID: 16489057 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3823]

编辑 李军亮 电编 鲁亚静



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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献。序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文。以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。(2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。(3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。(4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ...。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注)。如同一表中另有一套  $P$  值, 则 <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为 <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ 。  $P$  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  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  表达。黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小  $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$ , 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴。(5) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。



# 健脾清热活血方介导Wnt/ $\beta$ -catenin通路对人结肠SW480细胞的影响

张保静, 张涛, 陈远能, 王小平, 潘怀耿

张保静, 张涛, 陈远能, 广西中医药大学附属瑞康医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530011  
王小平, 江西中医药高等专科学校 江西省抚州市 344700  
潘怀耿, 广州中医药大学 广东省广州市 510405  
张保静, 在读硕士, 主要从事消化系疾病的研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 81001507; No. 81260536  
广西卫生厅重点基金资助项目, No. 2011041  
作者贡献分布: 张保静与张涛对此文所做贡献均等; 张涛为课题总负责人; 本课题由张涛、陈远能、王小平及张保静设计; 文献检索、实验过程及数据分析由张保静与潘怀耿完成; 研究所用试剂与工具由张涛与陈远能提供; 论文撰写由张保静完成。  
通讯作者: 张涛, 副教授, 530011, 广西壮族自治区南宁市华东路10号, 广西中医药大学附属瑞康医院消化内科。  
zhangxuan271@yahoo.com  
收稿日期: 2013-01-04 修回日期: 2013-01-28  
接受日期: 2013-02-18 在线出版日期: 2013-03-28

## Treatment with Jian-pi-qing-re-huo-xue decoction regulates SW480 cell apoptosis by altering Wnt/ $\beta$ -catenin expression

Bao-Jing Zhang, Tao Zhang, Yuan-Neng Chen, Xiao-Ping Wang, Huai-Geng Pan

Bao-Jing Zhang, Tao Zhang, Yuan-Neng Chen, Department of the Gastroenterology, the Ruikang Hospital Affiliated Guangxi University of TCM, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China  
Xiao-Ping Wang, the Jiangxi TCM College, Fuzhou 344700, Jiangxi Province, China  
Huai-Geng Pan, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China  
Supported by: National Natural Fund, No. 81001507; No. 81260536; Key Project of Health Department of Guangxi, No. 2011041  
Correspondence to: Tao-Zhang, Associate Professor, Department of the Gastroenterology, the Ruikang Hospital Affiliated Guangxi University of TCM, 10 Huadong Road, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. zhangxuan271@yahoo.com.  
Received: 2013-01-04 Revised: 2013-01-28  
Accepted: 2013-02-18 Published online: 2013-03-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of treatment with Jian-pi-qing-re-huo-xue decoction on SW480 cell proliferation and apoptosis and the expression of  $\beta$ -catenin, TCF-4, c-myc and cyclin D1.

**METHODS:** SW480 cells were divided into a blank group, an intervention group and a control group, which were incubated with fetal calf serum, different concentrations of serum containing Jian-pi-qing-re-huo-xue decoction, or serum containing mesalamine for 24 h, respectively. The proliferation and apoptosis of SW480 cells were detected by MMT assay and flow cytometry, respectively. The mRNA and protein expression of  $\beta$ -catenin, TCF-4, c-myc, and cyclin D1 was assayed by real-time PCR and Western blot.

**RESULTS:** Compared to the blank group, the survival of SW480 cells was reduced in the intervention group ( $P < 0.05$ ). When the dilution concentration of Jian-pi-qing-re-huo-xue decoction was 5%, 10%, 15%, 20% and 30%, the reduced rate of cell growth was 28%, 44.58%, 65.86%, 57.86% and 49.89%, respectively. However, this inhibitory effect was not concentration-dependent ( $P > 0.05$ ). Intervention with Jian-pi-qing-re-huo-xue decoction significantly increased the percentage of cells at S phase and decreased that of cells at G<sub>1</sub> in a concentration-dependent manner compared to the control group (both  $P < 0.05$ ).  $\beta$ -catenin was more abundantly expressed in the nucleus in the blank group. In the intervention group, the ectopic expression of  $\beta$ -catenin in the cytoplasm and nucleus declined, and membrane expression increased ( $P < 0.05$ ). Treatment with Jian-pi-qing-re-huo-xue decoction induced cell apoptosis and down-regulated the expression of  $\beta$ -catenin, TCF-4, c-myc, and cyclin D1 compared to the blank group ( $P < 0.01$ ), and the effect was more significant when middle concentration of serum containing the decoction was used.

**CONCLUSION:** Jian-pi-qing-re-huo-xue decoction exerts a distinct preventive and therapeutic effect on colon cancer possibly by altering the expression of Wnt/ $\beta$ -catenin, affecting cell cycle progression and inducing cell apoptosis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

## ■背景资料

溃疡性结肠炎与结肠癌之间存在因果关系已得到消化界公认, Wnt通路调控 $\beta$ -catenin磷酸化(P- $\beta$ -catenin)、 $\beta$ -catenin核内异常转录在介导溃疡性结肠炎相关癌变的(UCAC)发生发展中具有重要的作用。健脾清热活血类方药在促进结肠上皮细胞修复及杯状细胞分泌保护因子, 加快肠道黏膜重建, 促进溃疡修复和抑制NF- $\kappa$ B活性及调节机体免疫方面显示了较好的效果, 但其对Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的影响尚未报道。

## ■同行评议者

牛英才, 研究员, 齐齐哈尔医学院医药科学研究所

## ■ 研发前沿

本研究采用血清药理学方法,运用MTT法、流式细胞仪、实时荧光定量PCR、免疫印迹法、免疫印光染色法,从基因转录和蛋白水平分析健脾清热活血方药对人结肠癌SW480细胞Wnt/ $\beta$ -catenin-TCF-4通路的影响,阐明复方中药的作用机制。

**Key Words:** Jian-pi-qing-re-huo-xue decoction;  $\beta$ -catenin; TCF-4; C-myc; CyclinD1; Wnt/ $\beta$ -catenin; Apoptosis

Zhang BJ, Zhang T, Chen YN, Wang XP, Pan HG. Treatment with Jian-pi-qing-re-huo-xue decoction regulates SW480 cell apoptosis by altering Wnt/ $\beta$ -catenin expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 745-753 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/745.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.745>

## 摘要

**目的:** 观察人结肠癌细胞SW480增殖、凋亡及 $\beta$ -catenin、T细胞因子4(T cell factor 4, TCF-4)、C-myc、CyclinD1表达变化,探讨健脾清热活血方防治结肠癌的可能机制。

**方法:** 将SW480细胞分为空白组、治疗组、对照组;采用血清药理学方法,空白组给予胎牛血清;治疗组分别给予等比稀释不同浓度含药血清;对照组给予美沙拉嗪含药血清干预体外培养的结肠癌细胞SW480(24 h),应用MTT法检测细胞增殖,流式细胞仪分析细胞凋亡率、细胞周期,免疫荧光染色分析细胞 $\beta$ -catenin蛋白表达,Western blot及荧光定量PCR检测 $\beta$ -catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1蛋白及mRNA表达。

**结果:** 与空白组比较,治疗组SW480细胞存活率明显下降( $P<0.05$ ),稀释浓度为5%、10%、15%、20%、30%的不同剂量组细胞生长抑制率分别为28.00%、44.58%、65.86%、57.86%、49.89%,但与药物浓度没有剂量依赖性( $P>0.05$ );与对照组比较,治疗组S期细胞增多、G<sub>1</sub>期细胞减少,且与药物浓度有剂量依赖性( $P<0.05$ );空白组 $\beta$ -catenin表达以核内表达为主,治疗组 $\beta$ -catenin胞质/核异位表达下降( $P<0.05$ ),以胞膜表达为主;与空白组比较,治疗组可明显下调 $\beta$ -catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1蛋白及mRNA表达并促进细胞凋亡( $P<0.01$ ),以中剂量更为明显。

**结论:** 健脾清热活血方可能通过介导Wnt/ $\beta$ -catenin通路,干预SW480细胞G<sub>1</sub>期,诱导细胞凋亡,发挥防治结肠癌的效应。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 健脾清热活血中药;  $\beta$ -catenin; T细胞因子4; C-myc; CyclinD1; Wnt/ $\beta$ -catenin; 凋亡

张保静, 张涛, 陈远能, 王小平, 潘怀耿. 健脾清热活血方介导Wnt/ $\beta$ -catenin通路对人结肠SW480细胞的影响. *世界华人消化杂志* 2013; 21(9): 745-753 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/745.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.745>

[wjgnet.com/1009-3079/21/745.asp](http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/745.asp) DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.745>

## 0 引言

结肠癌与炎症密切相关,80%结肠癌缺乏基因易感的依据,2008年分别发表在《Nature》

《Carcinogenesis》等杂志的研究文章也清楚表明:炎症已成为致癌的第7大致癌因素<sup>[1,2]</sup>。溃疡性结肠炎与结肠癌之间存在因果关系已得到消化界公认,溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者结肠组织上皮异性增生(高级别或低级别)发生在进展期大肠癌之前,内镜检查可见单发或多发腺瘤样假性息肉改变,这些病理改变被看作是癌前状态<sup>[3]</sup>。溃疡性结肠炎相关癌变(ulcerative colitis associated carcinogenesis, UCAC)是涉及多基因、多信号的复杂过程,Wnt通路调控 $\beta$ -catenin磷酸化(P- $\beta$ -catenin)、 $\beta$ -catenin核内异常转录介导UCAC发生发展中具有重要地位<sup>[4]</sup>。我们前期在体试验研究结论,初步证实健脾清热活血类方药具有不良反应低,提高溃疡性结肠炎溃疡愈合质量,缓解溃疡性结肠炎临床疗效<sup>[5]</sup>。为进一步揭示其防治结肠癌的可能机制,课题组采用血清药理学方法,以公认有效的美沙拉嗪为对照组,观察其对SW480细胞增殖、凋亡及其关键通路Wnt/ $\beta$ -catenin的影响,探讨健脾清热活血类方药防治人结肠癌的生物学机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人结肠癌细胞株SW480购自上海细胞库;SPF级 $\delta$ 大鼠,200 g $\pm$ 20 g,购自广西医科大学动物实验中心,动物许可证号:SCXK桂2009-0002,动物合格证号:0001869;健脾清热活血方购自广西中医学院第一附属医院仁爱分院;美沙拉嗪肠溶颗粒剂(商品名:艾迪莎)(批号:H20070727)购自广西中医学院附属瑞康医院;DMEM培养液、南美洲胎牛血清FBS(Hyclone);总RNA提取试剂盒(离心柱型,DP419,北京天根);MTT噻唑(Amresco)、二甲基亚砜(DMSO)(OACS Grade)(广西天地扬);逆转录试剂盒(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)(Ferments)(#K1621 #K1622)、引物(上海生工);Alexa Fluor 488 annexinV/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry(invitrogen)、凯基细胞DNA含量检测试剂盒(细胞周期)(广西阳光实

验); FS Universal SYBR Green Mas(广州聚研); 蛋白提取液(碧云天)、十二羟硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)(广州威佳); 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)(Sigma); 甘油(glycerol)(国产); 丙烯酰胺(Acrylamide)(Sigma); N,N'-亚甲基丙烯酰胺(Bis-Acrylamide)(Sigma); 四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)(上海生工); 过硫酸铵(ammomium persulfate, AP)(国产广州化学试剂厂); 甘氨酸(Glycine)(鼎国); Tris碱(Trisbase)(Sigma); 甲醇(methanol)(广州化学试剂厂); 吐温-20(Tween-20)(Sigma); 脱脂奶粉(伊利); PVDF膜(BIO RAD); 荧光一抗c-fos(sc-16743-R-FITC, santa-cruz, 美国); PBS(北京中杉金桥); Tween 20(Amresco 9005-64-5); 染核试剂DAPI(sigma, D9564, 美国); 倒置相差显微镜(Axiovert200, 德国Zeiss); 全自动酶标仪(BIO-RAD); 7500荧光PCR仪; CO<sub>2</sub>培养箱(HEPA FILTER); 多通道PCR扩增仪(PTC-220, 美国MJ); SZ-93自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣); BIO-RAD电泳仪(Power/Pac300, 美国BIO-RAD); 凝胶成像分析系统(Bio-Rad Gel doc2000, 美国); 低速大容量离心机(LXJ-II B, 上海安亭); 高速低温离心机(5810R Eppendorf Centrifuge, 德国); 细胞流式分析仪(FACSCalibur)及统计软件(FACSCalibur); 超声细胞破碎仪(上海天呈); 垂直电泳仪及转移系统(BIO RAD); 射线摄影暗匣(5×7英寸、富士X光片、发光暗盒, 广州艺佳); 脱色摇床(Rotomix公司); PVDF膜(BIO RAD)、内参抗体(广州艺佳); HRP标记二抗(武汉博士德); 蔡司激光共聚焦显微镜LSM 700.

## 1.2 方法

1.2.1 实验药物制备: 健脾清热活血方药组方为救必应15 g、白术10 g、白芍15 g、水蛭10 g、三七10 g、炙甘草6 g. 用蒸馏水煎成健脾清热活血方药液, 浓缩配制成1 g原生药/1 mL的药液, 过滤分装4℃保存备用. 美沙拉嗪肠溶颗粒剂用蒸馏水配制药液, 过滤分装4℃保存备用.

1.2.2 含药血清制备: 将20只SD大鼠, 按体质量随机分为对照组和治疗组, 每组10只. 给药剂量参照“人和动物按体表面积折算的等效剂量比率表”计算<sup>[6]</sup>. 参考公式: 给药剂量 = 临床常用量×动物等效剂量系数(按体表面积)×培养液内稀释度. 给药方式: 治疗组给予健脾清热活血中药, 对照组给予美沙拉嗪, 空白组给予等量的生理盐水, 以灌胃形式给予处理, 1次/d, 连续7 d. 采血时相: 末次给药2 h后, 用10%的水合氯醛以

体重0.03 mL/100 g的比例行麻醉处理, 于腹主动脉取血, 室温下静置2 h, 于4℃、3 000 r/min、离心15 min后取得血清, 同种条件下血清混匀, 56℃、30 min灭活处理, 0.22  $\mu$ m滤膜过滤除菌, 置于-20℃保存备用.

1.2.3 MTT法检测人结肠癌SW480细胞增殖: 将人结肠癌细胞SW480接种于含10%胎牛血清的DMEM培养液中, 置于含5%CO<sub>2</sub>、37℃的培养箱中培养. 取处于对数生长期的细胞, 用0.25%的胰酶消化下来, 用DMEM培养液制成细胞悬液, 200  $\mu$ L/孔, 以4×10<sup>3</sup>个/孔的密度接种于96孔板中, 继续培养24 h, 用微量移液器移去培养液, 血清添加方式参考文献[7], 略作修改, 治疗组分别加入不含胎牛血清的DMEM培养基200  $\mu$ L、稀释浓度分别为5%、10%、15%、20%、30%的含药血清, 对照组加入不含胎牛血清的DMEM培养基2 mL、稀释浓度为0.5 mmol/L的美沙拉嗪含药血清, 空白组是含10%胎牛血清的DMEM培养液, 每组设5个复孔, 继续培养24、48、72 h后, 每孔加入20  $\mu$ L的MTT溶液(5 mg/mL), 37℃孵育4 h后, 用1 mL注射器小心吸取每孔中的培养液, 再分别加入200  $\mu$ L的DMSO, 于微型振荡器上振荡10 min后, 用全自动酶标仪测定各孔(570 nm)吸光度(A)值.

计算公式: 肿瘤细胞生长抑制率(%) = (对照孔平均A值-加药组平均A值)/对照孔的平均A值乘以100%.

1.2.4 流式细胞仪检测人结肠癌SW480细胞周期及凋亡: 取处于对数生长期的细胞, 用DMEM培养液制成细胞悬液, 2 mL/孔, 以3×10<sup>5</sup>个/孔的密度接种于6孔板中, 培养24 h后给药. 移去培养液, 血清添加方式参考文献[7], 略作修改, 治疗组分别加入不含胎牛血清的DMEM培养基、稀释浓度分别为5%、15%、25%的含药血清, 对照组加入不含胎牛血清的DMEM培养基2 mL、稀释浓度为0.5 mmol/L的美沙拉嗪含药血清, 空白组加入含10%胎牛血清的DMEM培养液, 继续培养24 h后, 分别用0.25%的不含EDTA的胰酶消化, 收集细胞, 采用凯基细胞DNA含量检测试剂盒(细胞周期)和Invitrogen凋亡试剂盒, 严格按照说明书操作步骤操作. 用美国BD公司生产的FACSCalibur流式细胞仪检测, 以cell quest pro统计软件分析PI荧光直方图上细胞周期和凋亡细胞百分率.

1.2.5 免疫印光染色技术检测人结肠癌SW480细胞 $\beta$ -catenin蛋白表达: 将与流式细胞仪检测方法

## ■ 相关报道

曹俊等研究发现胃泌素与其受体作用后可使结肠癌细胞中 $\beta$ -catenin分布发生转移并激活 $\beta$ -catenin/Tcf-4通路来降低结肠癌细胞的黏附, 增加肿瘤细胞的侵袭和转移, 但上述研究主要集中在中药单体抗肿瘤作用与Wnt/ $\beta$ -catenin信号转导的关系, 本研究从中药复方调控Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路干预UCAC入手, 研究结果将有助于探讨中药复方干预溃疡性结肠炎癌变的靶点机制.



## ■创新盘点

临床研究发现,美沙拉嗪、阿司匹林等药物可通过抑制Wnt信号通路,提高结肠癌细胞内 $\beta$ -catenin的磷酸化水平,稳定其转录失活状态,阻滞Wnt/ $\beta$ -catenin-TCF/LEF对下游靶基因的转录活性调节而发挥抗癌效应。但由于不良反应过大、患者耐受差,往往限制其临床使用。中医药因其天然、疗效明确且具有不良反应低、价格低廉等优势日益受到青睐,健脾清热活血方具有多环节、多靶点缓解溃疡性结肠炎的作用,结合现代医学,从分子水平深入探讨其防治溃疡性结肠炎癌变的作用机制,具有重要的理论与应用价值。

表1  $\beta$ -catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1引物序列

基因名称	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	扩增长度(bp)
$\beta$ -catenin	GGTGAATGCTTGGTTCACC	CGCACTGCCATTTTAGCTCC	112
TCF-4	CCACAGCTATGCCTGGTGGT	AAGGCCGGTTCATACCCCT	127
C-myc	AGGCGAACACACAACGCTTG	GGGCCTTTTCATTGTTTCCA	116
CyclinD1	ACCTGAGGAGCCCCAACAAAC	GCTTCGATCTGCTCCTGGC	132
$\beta$ -actin	GCATGGGTGAGAAGGATTCTT	TCGTCCAGTTGGTGACGAT	106

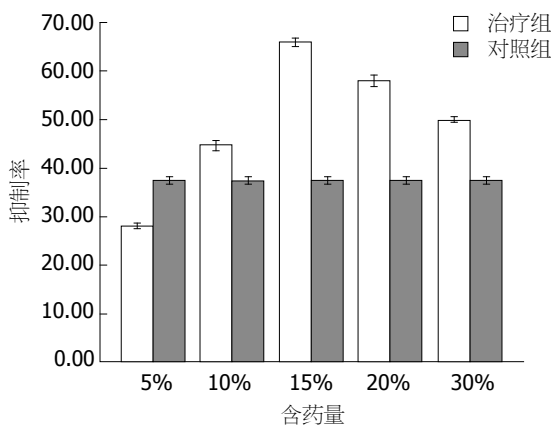


图1 各组结肠癌SW480细胞增殖率比较

条件下处理过的细胞,应用免疫印光染色技术检测 $\beta$ -catenin蛋白表达,具体步骤严格按照试剂说明书进行操作,以AlphaImager2200分析系统对蛋白条带进行含量分析。

1.2.6 Western blot技术检测人结肠癌SW480细胞 $\beta$ -catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1蛋白表达:将与流式细胞仪检测方法条件下处理过的细胞,应用Western blot技术检测 $\beta$ -catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1蛋白表达,具体步骤严格按照试剂说明书进行操作。同时以 $\beta$ -actin作为内参,用光密度扫描仪对蛋白含量进行密度分析,以目的蛋白与 $\beta$ -actin的密度比值作为目的蛋白的相对含量。

1.2.7 荧光定量PCR检测人结肠癌SW480细胞 $\beta$ -catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1 mRNA表达:将与流式细胞仪检测方法条件下处理过的细胞,应用实时荧光定量PCR法(Real-time PCR),以 $\beta$ -actin为内参,检测 $\beta$ -catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1的mRNA表达,具体步骤严格按照试剂说明书进行操作,各样品的荧光信号值由荧光定量PCR仪的支持软件ABI Prism7000SDS software实时产生并自动计算定量数值,以目的基因与 $\beta$ -actin的mRNA表达比值作为目的基因的相对表达量。 $\beta$ -catenin、

TCF-4、C-myc、CyclinD1引物序列见表1。

**统计学处理** 实验数据以mean $\pm$ SD表示,用SPSS11.5 for Windows软件进行数据处理与分析。Oneway Analysis Of Variance(One-way ANOVA)进行各组间方差分析,方差齐同时用LSD法,方差不齐时用Tambane'S T2法,  $P < 0.05$ 为有统计学意义。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。实验重复3遍以上。

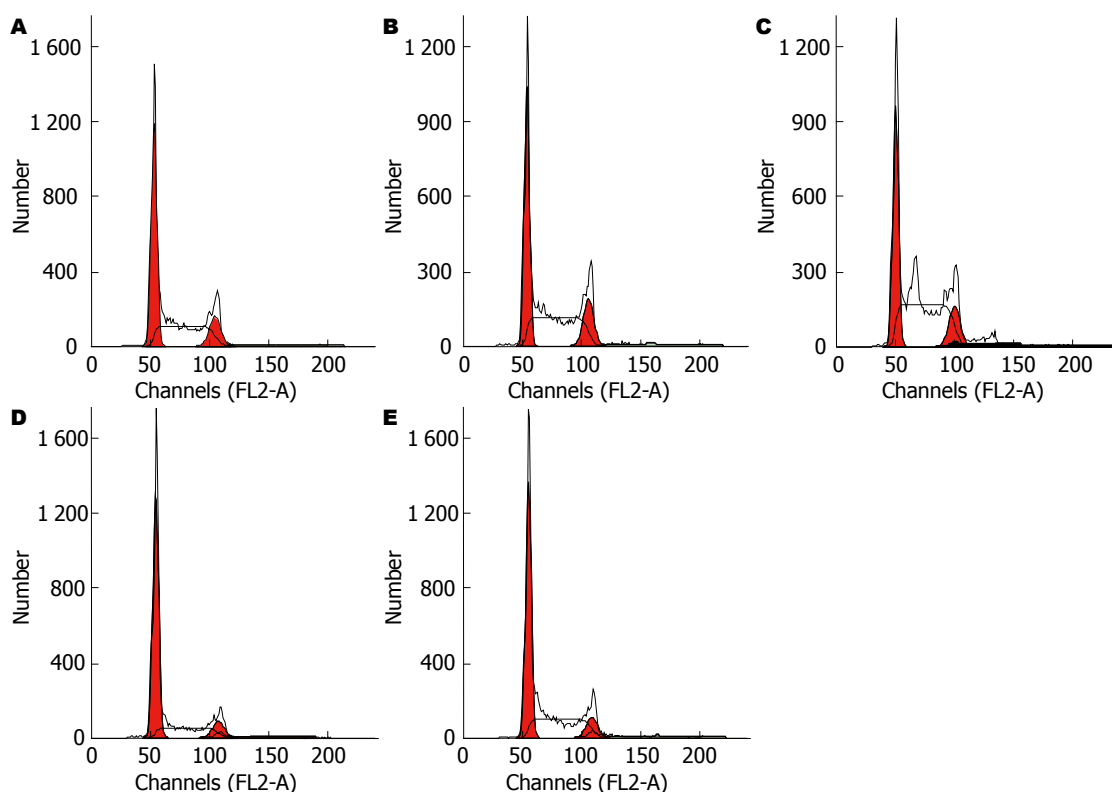
## 2 结果

2.1 健脾清热活血中药对人结肠癌SW480细胞增殖的影响 治疗组与SW480细胞共同孵育24、48、72 h后,10%的含药血清浓度24 h时出现明显的抑制作用( $P < 0.05$ ),其抑制率是57.86%,半数抑制率的含药血清浓度是13.70%,但48、72 h后没有明显的抑制的作用,可能与含药血清本身的药理动力学有关,故后续的实验都只取24 h这个时间段来检测各个指标(图1)。

2.2 健脾清热活血中药对人结肠癌SW480细胞周期影响 应用FCM定量分析,治疗组SW480细胞的S期细胞增多、G<sub>1</sub>期细胞减少,且与药物浓度有剂量依赖性( $P < 0.05$ ),与对照组比较有统计学差异( $P < 0.05$ ,图2)。

2.3 健脾清热活血中药对人结肠癌SW480细胞凋亡影响 应用流式细胞仪检测,治疗组干预SW480细胞作用24 h后,治疗组细胞凋亡率较空白组增高( $P < 0.05$ ),但与剂量无依赖性。这说明,健脾清热活血中药可诱导细胞凋亡(表2,图3)。

2.4 健脾清热活血中药对人结肠癌SW480细胞 $\beta$ -catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1蛋白表达 免疫荧光染色分析显示,空白组 $\beta$ -catenin阳性表达以核内高表达为特点,各治疗组 $\beta$ -catenin阳性表达呈下降趋势且以膜表达为主,不存在膜缺失现象,与空白组比较,均有统计学差异( $P < 0.05$ )。Western blot分析显示,治疗组 $\beta$ -catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1蛋白表达均呈下降趋势,与空白组比较有统计学意义( $P < 0.01$ ),其中低、中剂量调节作用更



## ■应用要点

本研究从体外细胞着手, 用含药血清干预人结肠癌细胞, 以不同浓度健脾清热活血方含药血清及公认治疗UCAC有效的西药美沙拉嗪作对照, 观察SW480细胞增殖、凋亡及其对Wnt/β-catenin-TCF-4通路的影响, 为阐明该复方中药治疗作用靶点提供理论依据。

图2 FCM检测各组人结肠癌SW480细胞周期变化. A, B, C: 分别为治疗组低、中、高剂量组; D: 对照组; E: 空白组。

表2 各组人结肠癌SW480细胞β-catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1 mRNA表达 (n = 5, mean ± SD)

分组	细胞凋亡率(%)	β-catenin mRNA	TCF-4 mRNA	C-myc mRNA	CyclinD1 mRNA
空白组	10.74 ± 0.93	2.23 ± 0.13	2.77 ± 0.47	2.54 ± 0.19	2.61 ± 0.13
对照组	22.71 ± 1.90 <sup>a</sup>	1.39 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.62 ± 0.21 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.12 <sup>a</sup>
低剂量组	13.50 ± 1.31 <sup>ab</sup>	1.62 ± 0.22 <sup>ab</sup>	1.83 ± 0.24 <sup>ab</sup>	1.71 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.71 ± 0.23 <sup>ab</sup>
中剂量组	15.80 ± 1.11 <sup>ab</sup>	1.53 ± 0.21 <sup>ab</sup>	1.74 ± 0.19 <sup>ab</sup>	1.63 ± 0.27 <sup>ab</sup>	1.55 ± 0.13 <sup>ab</sup>
高剂量组	14.47 ± 1.27 <sup>ab</sup>	1.85 ± 0.11 <sup>ab</sup>	2.04 ± 0.12 <sup>ab</sup>	1.84 ± 0.31 <sup>ab</sup>	1.89 ± 0.11 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 空白组; <sup>b</sup>P<0.05 vs 对照组。

表3 各组人结肠癌SW480细胞β-catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1蛋白表达 (n = 5, mean ± SD)

分组	细胞凋亡率(%)	β-catenin蛋白	TCF-4蛋白	C-myc蛋白	CyclinD1蛋白
空白组	10.74 ± 0.93	2.02 ± 0.03	2.16 ± 0.33	2.15 ± 0.35	2.02 ± 0.15
对照组	22.71 ± 1.91 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.31 <sup>a</sup>	1.36 ± 0.17 <sup>a</sup>
低剂量组	13.50 ± 1.31 <sup>ab</sup>	1.57 ± 0.15 <sup>ab</sup>	1.75 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.65 ± 0.17 <sup>ab</sup>	1.69 ± 0.11 <sup>ab</sup>
中剂量组	15.80 ± 1.11 <sup>ab</sup>	1.46 ± 0.18 <sup>ab</sup>	1.66 ± 0.11 <sup>ab</sup>	1.44 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.52 ± 0.23 <sup>ab</sup>
高剂量组	14.47 ± 1.27 <sup>ab</sup>	1.73 ± 0.11 <sup>ab</sup>	1.89 ± 0.14 <sup>ab</sup>	1.72 ± 0.18 <sup>ab</sup>	1.73 ± 0.25 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 空白组; <sup>b</sup>P<0.05 vs 对照组。

佳(P<0.01)。β-catenin核内积聚, 下游靶基因TCF-4、C-myc、CyclinD1高表达可能是结肠癌变的关键所在, 健脾清热活血方药具有干预β-catenin核内积聚以及TCF-4、C-myc、Cy-

clinD1表达的作用。这说明, 健脾清热活血方药可干预β-catenin核内积聚以及调节下游靶基因TCF-4、C-myc、CyclinD1表达的作用(图4, 5, 表3)。

### ■名词解释

根据世界卫生组织1980年专家会议将“癌前病变的组织学定义”分为癌前状态和癌前病变两个范畴,溃疡性结肠炎相关癌变包括两个方面:一是溃疡性结肠炎为结肠癌前状态;二是结肠上皮内瘤变(表现为内镜下单发或多发的腺瘤样假性息肉改变)为结肠癌前病变。

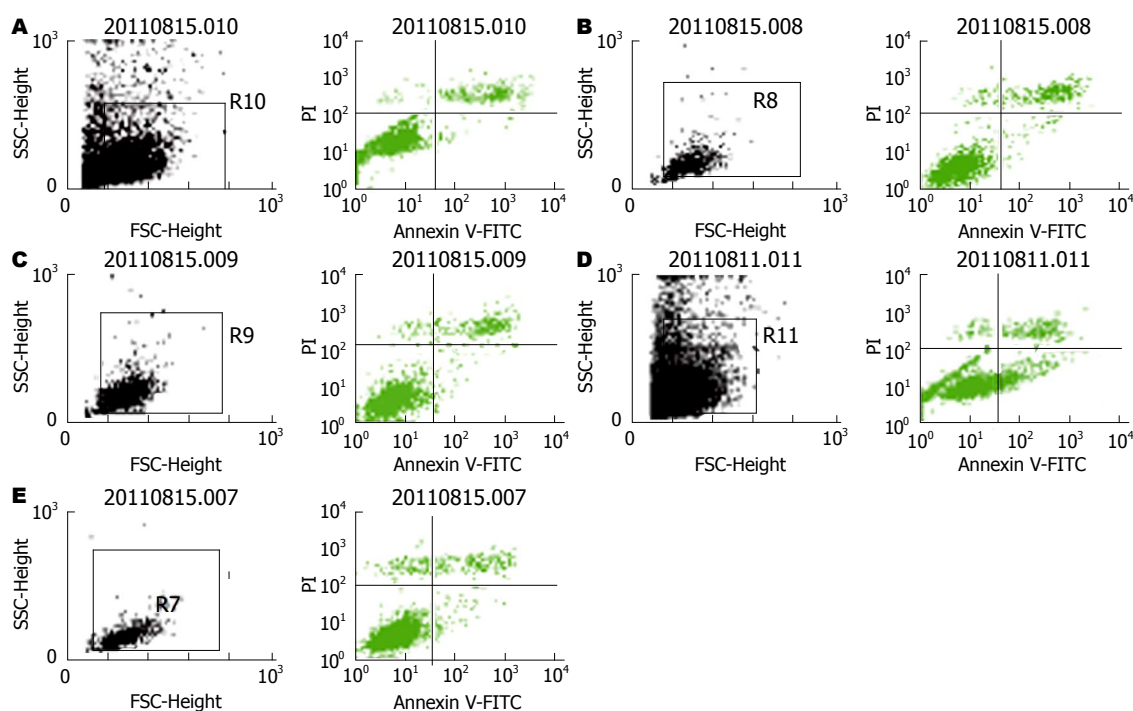


图3 FCM检测各组人结肠癌SW480细胞凋亡率。A, B, C: 分别为治疗组低、中、高剂量组; D: 对照组; E: 空白组。

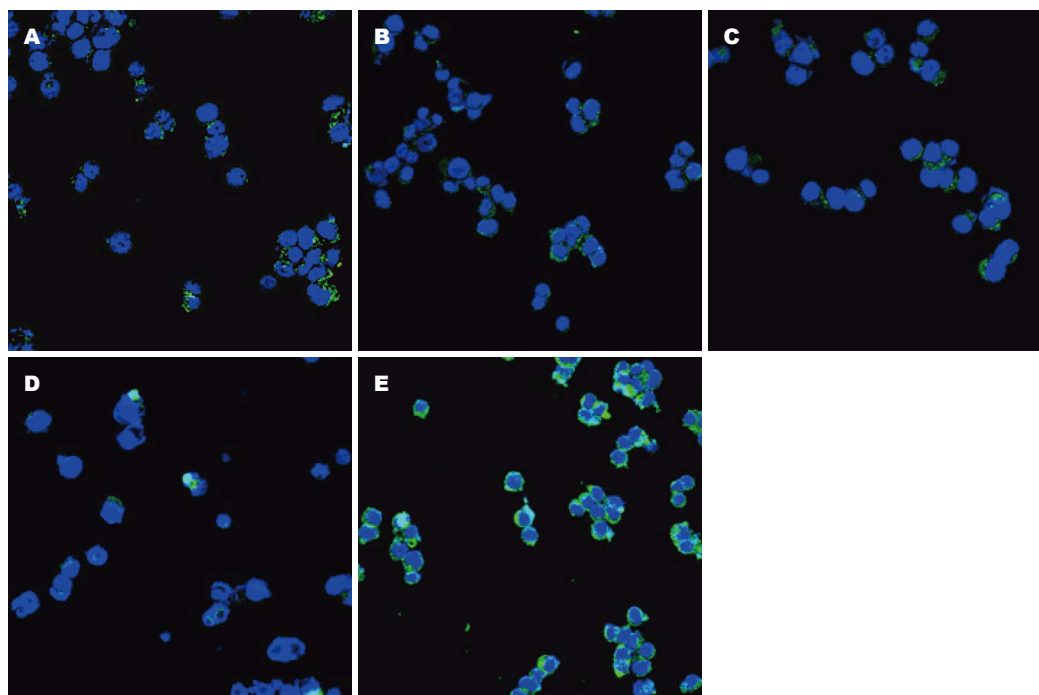


图4 各组结肠癌SW480细胞β-catenin蛋白的免疫荧光染色。A, B, C: 分别为治疗组低、中、高剂量组; D: 对照组; E: 空白组。

2.5 健脾清热活血中药对人结肠癌SW480细胞β-catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1 mRNA表达 各治疗组β-catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1 mRNA表达呈下降趋势,与空白组比较均有统计学差异( $P < 0.01$ )。这说明,结肠癌变存在β-catenin mRNA高表达,导致下游靶基因

β-catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1过度转录的特点,健脾清热活血方药可能干预上述靶点,发挥治疗效应(表2)。

### 3 讨论

健脾清热活血方是全国名老中医、广州中医药



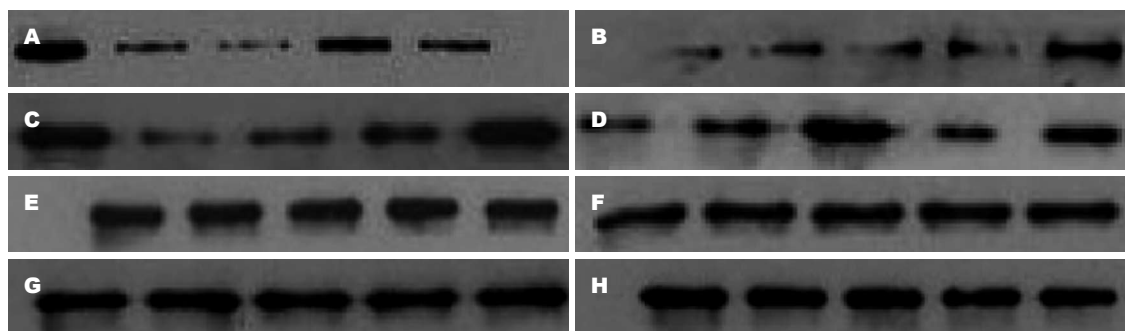


图5 各组结肠癌SW480细胞 $\beta$ -catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1蛋白表达。A-D: 基因 $\beta$ -catenin、TCF-4、C-myc、CyclinD1目的基因蛋白的表达; E-H: 相应内参基因蛋白的表达。其中蛋白图中从左至右分别为空白组、对照组、治疗组低、中、高剂量组。

#### ■同行评价

本文目标明确, 设计合理, 研究方法较先进, 实验数据可靠, 创新性较好, 有一定的科学意义。

大学终身教授劳绍贤在总结多年治疗溃疡性结肠炎经验基础上, 精心筛制而成, 临床疗效确切<sup>[8,9]</sup>。该方由白术、炙甘草、救必应、白芍、水蛭、三七等药物组成, 诸药合用共奏健脾利湿、清热解毒、活血定痛之效。我们前期临床研究结果提示健脾清热活血方可能通过促进结肠上皮细胞修复及杯状细胞分泌保护因子, 加快肠道黏膜重建, 促进溃疡修复过程; 下调过量表达的IKK- $\alpha$ 蛋白水平, 从而抑制NF- $\kappa$ B活性, 调节机体免疫, 因而发挥干预溃疡性结肠炎相关癌变的治疗效应<sup>[10-13]</sup>。为进一步阐明健脾清热活血方防治溃疡性结肠炎相关癌变的作用机制, 课题组采用血清药理学方法, 以公认有效的美沙拉嗪为对照组, 观察了不同浓度含药血清防治结肠癌的可能机制及其效应, 细胞增殖、周期及凋亡率均证实健脾清热活血方可以抑制SW480细胞增殖, 干预细胞G<sub>1</sub>期, 诱导细胞凋亡, 提示健脾清热活血方可有效防治结肠癌。

多项研究均已证实, UC长期患者发生癌变的危险性升高, 在确诊8-10年后, 癌变风险有逐年增长0.5%-1.0%之趋势, 一项荟萃分析显示, 10、20及30年UC患者癌变发生率分别为2%、8%、18%<sup>[14]</sup>, 而因此所导致的死亡人数占总体患者的15%<sup>[15]</sup>。尽管UC癌变机制目前尚未明确, 但是现代研究已证实Wnt信号通路与UC癌变的发生有着密切的关系, 其中 $\beta$ -catenin核内异常转位及其下游靶基因过度转录被认为是UC癌变的关键事件之一。 $\beta$ -catenin是Wnt信号通路中最关键的转导子<sup>[16,17]</sup>, 是一种多功能胞质蛋白, 在细胞内存在于细胞膜、细胞质及细胞核中, 含有781个氨基酸, 分子量在92-95 kDa, 其氨基末端含数个GSK-3 $\beta$ 的磷酸化位点, 羧基末端有活化相应靶基因转录的功能, 中间区域形成 $\alpha$ -螺旋和连接环结构, 含有Cadherin、APC蛋白及TCF结

合的位点, 这些分子的结构特点决定了 $\beta$ -catenin在Wnt信号传导中起枢纽作用<sup>[18]</sup>。结直肠癌与 $\beta$ -Catenin/T细胞因子(TCF)介导的特异转录有关, TCF和 $\beta$ -catenin形成复合物是靶基因激活的先决条件,  $\beta$ -Catenin缺少DNA结合活性, 却有转录活性区, 而Tcf兼有 $\beta$ -catenin结合域和结合DNA活性, 无转录活性, 两者结合形成具有转录功能的复合体, 在核内共同调控下游靶基因包括30多种调节细胞增殖和侵袭转移原癌基因如c-myc、cyclinD1等转录活性上调, 诱导细胞恶变, 从而完成Wnt信号的最终效应<sup>[19]</sup>。临床研究也证实<sup>[20]</sup>大肠正常黏膜-腺瘤-腺癌中 $\beta$ -catenin阳性表达分别以细胞膜、细胞浆、胞浆/核为主, 同时也证明了 $\beta$ -catenin首先在细胞浆内累积, 后转移到细胞核与转录因子TCF结合, 激活相关靶基因的理论。TCF-4作为结肠黏膜主要表达细胞因子和Wnt信号通路中的分子开关, 在调控细胞癌变过程中具有促进细胞增殖分化和抑制细胞过度生长、防止肿瘤发生的双重效应, 其突变可致肿瘤发生<sup>[21]</sup>, 更重要的是TCF-4- $\beta$ -Catenin复合体及下游靶基因的转录激活是结直肠癌细胞恶性转化的一个标志, 且这些基因的构成性激活对维持恶性表现型来说是必需的<sup>[22]</sup>。经研究证实的 $\beta$ -catenin/TCF最为重要的下游靶基因C-myc, 具有与染色体DNA结合特性, 可使细胞无限增殖和促进细胞分裂, 在调节细胞生长、分化及恶性转化中发挥作用<sup>[23]</sup>, 并有着和其他癌基因协同的作用, 共同参与肿瘤的发生、发展。研究表明细胞浆内 $\beta$ -catenin的聚集及c-myc的高表达与结肠癌的形成有关<sup>[24]</sup>, 而且 $\beta$ -catenin的表达与c-myc呈正相关, 这可能与Wnt通路活化后细胞浆中 $\beta$ -catenin的增加从而调控c-myc的表达有关<sup>[25]</sup>。因此, 逆转 $\beta$ -catenin核内聚集及抑制 $\beta$ -catenin、c-myc表达可达到抑制肿瘤发生目的。肿瘤作为一种细胞周

期性疾病, 细胞周期素1(cyclinD1)是细胞周期重要的正调控因子且在肿瘤的发生发展过程起着重要的作用<sup>[26-28]</sup>, 其含量及活化程度在细胞增殖周期卡点G<sub>1</sub>/S期转换过程中起限速作用. 相关文献报道<sup>[29]</sup>, CyclinD1于结肠癌细胞株中表达下调, 能抑制结肠癌细胞的增殖, 从而反证了CyclinD1过度表达能促进结肠癌细胞增殖的结论. 因此CyclinD1可能通过促进细胞周期而促进细胞增殖来参与结肠癌的发生, 通过抑制其基因表达, 可以达到抑制肿瘤生长目的. 综上可知, 这一复杂的Wnt/ $\beta$ -catenin -TCF/LEF信号通路, 其关键点在于多种因素对细胞内 $\beta$ -catenin水平的影响,  $\beta$ -catenin的高低最终决定靶基因的转录水平, 因此调控细胞内 $\beta$ -catenin水平, 介导 $\beta$ -catenin降解是干预Wnt信号通路防治溃疡性结肠炎癌变的关键事件之一. 临床研究表明<sup>[30,31]</sup>, 既往未被用于治疗癌症的某些药物, 具有明确的化学预防结肠癌的效应, 可以抑制Wnt信号通路, 比如非甾体类抗炎药物舒林酸阿司匹林、异布洛芬上述药物可以提高结肠癌细胞内 $\beta$ -catenin的磷酸化水平, 稳定其转录失活状态, 阻滞Wnt/ $\beta$ -catenin-TCF/LEF对下游靶基因的转录活性调节, 发挥抗癌效应. 但由于上述药物副作用过大、患者耐受差, 往往限制临床使用. 本研究结果发现, 空白组 $\beta$ -catenin表达以核内表达为主, 各治疗组 $\beta$ -catenin以膜内表达为主, 不存在膜表达缺失现象, 而且各治疗组的 $\beta$ -catenin、C-myc、CyclinD1、TCF-4 mRNA和蛋白较空白组相比, 均呈现下降趋势, 其中以低、中剂量疗效最为明显. 上述变化与细胞增殖、周期与凋亡变化呈正相关. 因此, 我们可以相信, 健脾清热活血中药可以调控 $\beta$ -catenin、C-myc、CyclinD1、TCF-4基因表达, 发挥抑制结肠癌的效应.

总之, 课题组推测健脾清热活血中药复方具有明确防治结肠癌变效应, 其机制可能与通过介导Wnt/ $\beta$ -catenin通路, 干预SW480细胞G<sub>1</sub>期, 诱导细胞凋亡, 从而发挥防治结肠癌的效应. 同时本研究结果也弥补了现代抗癌药物的不足, 对防治溃疡性结肠炎相关癌变发生具有深远意义.

#### 4 参考文献

- Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 2008; 371: 771-783 [PMID: 18275997 DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60241-X]
- Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh

hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1073-1081 [PMID: 19468060 DOI: 10.1093/carcin/bgp127]

- Goldacre MJ, Wotton CJ, Yeates D, Seagroatt V, Jewell D. Cancer in patients with ulcerative colitis, Crohn's disease and coeliac disease: record linkage study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 297-304 [PMID: 18334873 DOI: 10.1097/MEG.0b013e3282f2a5e2]
- Risques RA, Lai LA, Brentnall TA, Li L, Feng Z, Gallaher J, Mandelson MT, Potter JD, Bronner MP, Rabinovitch PS. Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage. *Gastroenterology* 2008; 135: 410-418 [PMID: 18519043 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.04.008]
- 李华燕, 张涛, 张颖芹. 健脾清热活血方与美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎的对比研究. *中国中西医结合消化杂志* 2011; 19: 227-230
- 李仪奎. 中药药理实验方法学. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 562
- 吴健宇, 穆静, 李仪奎. 血清药理学方法体外实验系统的血清添加量问题. *上海中医药杂志* 2001; 9: 8-11
- 常东, 劳绍贤, 樊亚巍, 陶永胜, 朱圣鹰, 张东坡. 溃结灵颗粒配合柳氮磺胺吡啶治疗大肠湿热型溃疡性结肠炎30例. *辽宁中医杂志* 2007; 34: 1566-1568
- 黄志新, 劳绍贤, 崔琦珍, 王汝俊, 胡旭光. 溃结灵颗粒治疗活动期溃疡性结肠炎的临床与实验研究. *中国中西医结合消化杂志* 2003; 11: 141-143
- 杜群, 李红, 王建华, 王汝俊. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠粘膜NF- $\kappa$ B p65蛋白表达及血清TNF- $\alpha$ 含量的影响. *广州中医药大学学报* 2007; 24: 396-399
- 杜群, 李红, 王汝俊, 李燕舞, 巫燕莉, 王建华. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜IKK- $\alpha$ 蛋白表达的作用. *中药材* 2008; 31: 1016-1018
- 常东, 刘子志, 李健, 冯春霞, 李辉, 何方. 大肠湿热型溃疡性结肠炎患者防御素、白细胞介素-8表达及溃结灵的干预作用. *中国中医药信息杂志* 2010; 17: 13-19
- 王喜周, 张涛, 陈远能, 黄适, 潘怀耿. 健脾清热活血类方药介导 $\beta$ -catenin、C-myc表达干预溃疡性结肠炎相关癌变研究. *中成药* 2012; 34: 226-229
- Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48: 526-535 [PMID: 11247898 DOI: 10.1136/gut.48.4.526]
- Munkholm P. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18 Suppl 2: 1-5 [PMID: 12950413 DOI: 10.1111/apt.12211.]
- Schneikert J, Behrens J. The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut* 2007; 56: 417-425 [PMID: 16840506 DOI: 10.1136]
- Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology* 2005; 129: 626-638 [PMID: 16083717 DOI: 10.1053]
- Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005; 434: 843-850 [PMID: 15829953 DOI: 10.1038]
- Battle E, Bacani J, Begthel H, Jonkheer S, Gregorieff A, van de Born M, Malats N, Sancho E, Boon E, Pawson T, Gallinger S, Pals S, Clevers H. EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* 2005; 435: 1126-1130 [PMID: 15973414]
- 张丽娟, 李梅, 陈云, 杨承纲. B-catenin、c-myc在结直

- 肠肿瘤中的表达及其意义. 结直肠肛门外科 2007; 13: 275-278
- 21 Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by Controlling the expression of EphB/ephrB. *Cell* 2002; 111:251-263 [PMID: 1240886]
  - 22 Fasolini M, Wu X, Flocco M, Trosset JY, Oppermann U, Knapp S. Hot spots in Tcf4 for the interaction with beta-catenin. *J Biol Chem* 2003; 278: 21092-21098 [PMID: 12657632 DOI: 10.1515/hsz-2011-0241]
  - 23 Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 2005; 19: 877-890 [PMID: 15833914 DOI: 10.1101]
  - 24 Valentini AM, Pirrelli M, Renna L, Armentano R, Caruso ML. P53 and beta-catenin in colorectal cancer progression. *Current Pharmaceutical Design* 2003; 9: 1932-1936 [PMID: 12871177 DOI: 10.2174/138161212800672750]
  - 25 徐晓, 陈卫昌, 林茂松, 张宝峰, 方静, 周琼, 胡莺, 邵恒骏.  $\beta$ -catenin/*c-myc*在结肠癌组织中的表达及其临床意义. 中国现代医药杂志 2007; 9: 1-4
  - 26 Zhou JX, Niehans GA, Shar A, Rubins JB, Frizelle SP, Kratzke RA. Mechanisms of G1 checkpoint loss in resected early stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 32: 27-38 [PMID: 11282426 DOI: 10.1016]
  - 27 Moghaddam SJ, Haghighi EN, Samiee S, Shahid N, Keramati AR, Dadgar S, Zali MR. Immunohistochemical analysis of p53, cyclinD1, RB1, c-fos and N-ras gene expression in hepatocellular carcinoma in Iran. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 588-593 [PMID: 17278226 DOI: 10.3748/wjg.v19.i1.144]
  - 28 Rose SL, Buller RE. The role of p53 mutation in BRCA1-associated ovarian cancer. *Minerva Ginecol* 2002; 54: 201-209 [PMID: 12063435]
  - 29 Morisaki T, Uchiyama A, Yuzuki D, Essner R, Morton DL, Hoon DS. Interleukin 4 regulates G1 cell cycle progression in gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 1994; 54: 1113-1118 [PMID: 8313369 DOI: 10.1158/1541-7786]
  - 30 Arber N, Levin B. Chemoprevention of colorectal neoplasia: the potential for personalized medicine. *Gastroenterology* 2008; 134: 1224-1237 [PMID: 18395100]
  - 31 Terdiman JP, Johnson LK, Kim YS, Sleisenger MH, Gum JR, Hayes A, Weinberg VK, McQuaid KR. Chemoprevention of colonic polyps with balsalazide: an exploratory, double-blind, placebo-controlled study. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2488-2496 [PMID: 19757048 DOI: 10.1007/s10620-009-0966-2]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



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

## • 消息 •

### 中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》 影响因子 0.873

**本刊讯** 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2011年《世界胃肠病学杂志(英文版)》总被引频次6 979次, 影响因子0.873, 综合评价总分88.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第1位、第3位、第1位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第11位、第156位、第18位; 其他指标: 即年指标0.219, 他引率0.89, 引用刊数619种, 扩散因子8.84, 权威因子2 144.57, 被引半衰期4.7, 来源文献量758, 文献选出率0.94, 地区分布数26, 机构分布数1, 基金论文比0.45, 海外论文比0.71。

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



# 下调paxillin高表达对结直肠癌细胞SW480细胞信号转导及超微结构的影响

郑建伟, 尹洪芳, 汪欣, 刘玉村, 万远廉, 朱静

## ■背景资料

的桩蛋白paxillin, 主要分布于黏着斑, 他是整合素信号通路中的关键分子, 是一种多结构域的LIM家族蛋白, 能为多种调节结构蛋白及信号转导蛋白提供结合位点, 在调节细胞信号传导、细胞的黏附与运动、组织结构形态及生长发育等方面发挥重要作用。近期研究表明paxillin表达量增高与多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。

郑建伟, 汪欣, 刘玉村, 万远廉, 北京大学第一医院普外科 北京市 100034

尹洪芳, 北京大学第一医院病理科 北京市 100034

朱静, 北京大学第一医院外科实验室 北京市 100034

郑建伟, 博士, 主要从事胃肠肿瘤发生发展分子生物学机制的研究。

作者贡献分布: 本课题由郑建伟完成; 研究过程由郑建伟、尹洪芳及朱静操作完成; 数据分析由郑建伟与尹洪芳完成; 论文写作由郑建伟完成; 汪欣指导课题的设计; 刘玉村与万远廉指导课题的开展。

通讯作者: 汪欣, 副教授, 主任医师, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院普外科, wangxin\_guo@hotmail.com  
电话: 010-83572430

收稿日期: 2013-02-03 修回日期: 2013-03-05

接受日期: 2013-03-08 在线出版日期: 2013-03-28

## SiRNA-mediated silencing of paxillin down-regulates ERK1/2 signaling and alters cell ultrastructure in colorectal carcinoma cell line SW480

Jian-Wei Zheng, Hong-Fang Yin, Xin Wang, Yu-Cun Liu, Yuan-Lian Wan, Jing Zhu

Jian-Wei Zheng, Xin Wang, Yu-Cun Liu, Yuan-Lian Wan, Department of General Surgery, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Hong-Fang Yin, Department of Pathology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Jing Zhu, Surgical Laboratory, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Correspondence to: Xin Wang, Associate Professor, Department of General Surgery, Peking University First Hospital, 8 Xishiku Avenue, Xicheng District, Beijing 100034, China. wangxin\_guo@hotmail.com

Received: 2013-02-03 Revised: 2013-03-05

Accepted: 2013-03-08 Published online: 2013-03-28

## Abstract

**AIM:** To study the effect of silencing of paxillin overexpression on cell signaling and ultrastructure in colorectal carcinoma cell line SW480.

**METHODS:** Using empty plasmid as a negative control, two siRNA fragments were transfected into a colorectal carcinoma cell line SW480 which overexpresses paxillin. Stably transfected cells were screened and three new cell lines NC, SW545 and SW782 were obtained, which car-

ried the negative control, the siRNA targeting the site 545-565, and the siRNA targeting the site 782-802, respectively. The expression and site-specific phosphorylation of paxillin, FAK, ERK1/2 and AKT1/2/3 were examined in the four cell lines by Western blot. Specimens were prepared with cultured carcinoma cells to observe cell ultrastructure by transmission electron microscopy.

**RESULTS:** Paxillin overexpression in SW545 cells was not silenced at all, whereas silenced paxillin overexpression and remarkably reduced phosphorylation of paxillin (Tyr118) were observed in SW782 cells. Expression of AKT1/2/3 and FAK as well as their site-specific phosphorylation were substantially the same in the four cell lines. Although expression of ERK1/2 was substantially the same in the four cell lines, significantly reduced phosphorylation of ERK1/2 (Thr202/Tyr204) was observed in SW782 cells. There was no distinct ultrastructural difference between NC cells and SW480 cells, whereas dramatic ultrastructural changes were observed in SW782 cells, such as much more microvilli, microfilament and microtubule bundles, lysosomes and much less mitochondria.

**CONCLUSION:** Paxillin overexpression may play an important role in the malignant transformation of colorectal carcinoma cells, which is characterized by dramatic ultrastructural changes that can be reversed by silencing paxillin overexpression. Activation of ERK1/2 signaling downstream of paxillin is indispensable for the malignant transformation of colorectal carcinoma cells.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Paxillin; siRNA; SW480 cells; Cell signal transduction; Cell ultrastructure

Zheng JW, Yin HF, Wang X, Liu YC, Wan YL, Zhu J. SiRNA-mediated silencing of paxillin down-regulates ERK1/2 signaling and alters cell ultrastructure in colorectal carcinoma cell line SW480. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 754-760 <http://www.wjgnet.com>

## ■同行评议者

樊祥山, 副主任医师, 南京大学医学院附属鼓楼医院病理科; 莫发荣, 副教授, 广西医科大学组织学与胚胎学教研室

wjgnet.com/1009-3079/21/754.asp DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.754>

## 摘要

**目的:** 探讨下调paxillin高表达对结直肠癌细胞SW480细胞信号转导及超微结构的影响。

**方法:** 设计两种siRNA片段并用其转染高表达paxillin的结直肠癌细胞SW480细胞系, 以空质粒作为阴性对照, 构建稳定转染细胞系。NC组为转染空质粒的细胞系, SW545组是稳定转染针对paxillin545-565靶基因位点的siRNA片段的细胞系, SW782组是稳定转染针对paxillin782-802靶基因位点的siRNA片段的细胞系。Western blot检测SW480、NC、SW545及SW782 4组细胞系中paxillin、FAK、ERK1/2及AKT1/2/3的表达及特异位点磷酸化水平。利用培养细胞制备切片, 透射电镜下观察几组细胞系的超微结构。

**结果:** SW545细胞paxillin的高表达无明显改变, SW782细胞paxillin的高表达被显著下调, SW782细胞paxillin(Tyr118)磷酸化水平也显著降低。SW782细胞ERK1/2的表达水平无明显变化, 但是ERK1/2(Thr202/Tyr204)磷酸化水平显著降低。SW782细胞AKT1/2/3及FAK的表达及特异位点磷酸化水平均无明显变化。与SW480细胞相比, NC组细胞无明显超微结构改变, 但是SW782细胞却发生了显著的超微结构变化, 具有明显增多的微绒毛、微丝微管束与溶酶体以及明显减少的线粒体。

**结论:** 下调paxillin高表达能够逆转SW480细胞典型的恶性转化细胞的超微结构特征, paxillin高表达可能通过磷酸化激活paxillin及ERK1/2信号转导通路从而在结直肠癌发生发展中起着非常重要的作用。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 桩蛋白; siRNA; SW480细胞系; 细胞信号转导; 超微结构

郑建伟, 尹洪芳, 汪欣, 刘玉村, 万远廉, 朱静. 下调paxillin高表达对结直肠癌细胞SW480细胞信号转导及超微结构的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 754-760 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/754.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.754>

## 0 引言

近期研究表明桩蛋白paxillin表达增高与结直肠癌的发生发展密切相关, 在转移性肾癌<sup>[1]</sup>、高转

移潜能骨肉瘤<sup>[2]</sup>及前列腺癌<sup>[3]</sup>等多种恶性肿瘤也存在paxillin的高表达及磷酸化水平增高。在前期研究中, 我们发现结直肠癌中存在paxillin高表达, 而且paxillin的表达水平与结直肠癌淋巴结转移与侵袭性正相关。桩蛋白Paxillin是整合素信号通路中的关键分子, 主要分布于粘着斑, 是一种多结构域的LIM家族蛋白, 能为多种调节结构蛋白及信号转导蛋白提供结合位点, 在调节细胞信号传导、细胞的黏附与运动、组织结构形态及生长发育等方面发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。FAK(focal adhesion kinase)<sup>[5]</sup>、AKT1/2/3(protein kinase B)以及ERK1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2)是与paxillin有着密切的结构和功能联系的几种信号转导通路的关键蛋白(图1), 他们在多种肿瘤的发生发展的作用已经被广泛研究。整合素分子的聚合能引起FAK最主要的活化位点397位酪氨酸残基的自主磷酸化, 从而使FAK的Src家族激酶结合位点暴露出来<sup>[6]</sup>, 形成相互激活的FAK/Src复合物, 继而激活若干下游信号转导通路<sup>[7]</sup>。Paxillin的关键活化位点118位酪氨酸残基能被FAK/Src复合物磷酸化<sup>[8,9]</sup>, 激活的paxillin能与ERK1/2结合并将其募集到粘着斑。在粘着斑, 活化的paxillin与Raf和MEK1/2结合, 引起ERK1/2的202位苏氨酸残基和204位酪氨酸残基的双磷酸化<sup>[10]</sup>。充分活化的ERK1/2通过激活分布于胞浆、细胞核以及线粒体<sup>[11]</sup>、溶酶体<sup>[12]</sup>、高尔基体<sup>[13]</sup>等细胞器的一系列下游底物而发挥其生物学效应, 负责调控胚胎发生以及细胞增殖、分化与凋亡等生理过程, 然而过度激活的ERK1/2信号转导通路与恶性肿瘤的进展和转移癌细胞的增殖有关<sup>[14,15]</sup>。Paxillin也能通过与ERK1/2<sup>[16]</sup>, AB1<sup>[17]</sup>, poly-A结合蛋白<sup>[18]</sup>和类固醇受体<sup>[19]</sup>的相互作用在基因表达调控中发挥重要作用。397位酪氨酸残基的磷酸化使得FAK能与PI3K(phosphoinositide 3-kinases)结合, 通过PDK1(3-phosphoinositide dependent protein kinase-1)磷酸化AKT1/2/3的308位苏氨酸残基从而激活PI3K/AKT信号转导通路。然而PI3K/AKT信号转导通路的充分激活还需要AKT1/2/3的473位丝氨酸自主磷酸化或依赖PDK2的磷酸化<sup>[21,22]</sup>。活化的AKT1/2/3进而磷酸化胞浆、细胞核内的多种底物, 从而调控细胞的代谢、蛋白合成、增殖、DNA修复和凋亡<sup>[23]</sup>, 也能刺激血管生成和上皮间变<sup>[24,25]</sup>。恶性肿瘤细胞的超微结构改变已被深入研究, 已经发现恶性肿瘤的一些超微结构改变与其恶性生物学行为密切相关。结直

## ■研究前沿

paxillin的表达异常与结直肠癌细胞SW480细胞超微结构的变化密切相关。尽管其详细机制尚未明了, 这些有意义的发现揭示了paxillin高表达以及ERK1/2等信号转导通路在结直肠癌发生发展中的重要作用。

## ■ 相关报道

恶性肿瘤细胞的超微结构改变已被深入研究,已经发现恶性肿瘤的一些超微结构改变与其恶性生物学行为密切相关。本课题组同时观察了稳定转染下调SW480细胞paxillin高表达前后结直肠癌细胞超微结构,结果发现高表达paxillin的SW480细胞中细胞骨架的解体以及线粒体增多、畸形肿胀和溶酶体的减少等超微结构改变符合典型恶性转化细胞的特征,而通过下调SW480细胞paxillin高表达能够逆转这些恶性转化超微结构改变。

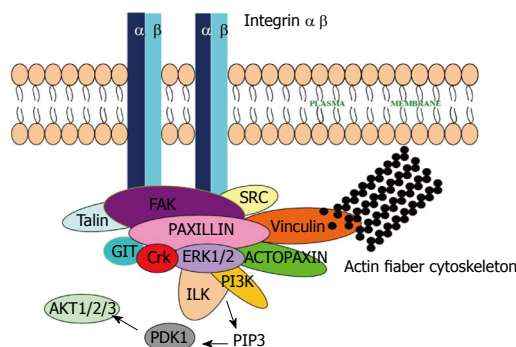


图1 FAK、AKT1/2/3及ERK1/2与paxillin的关系。

肠癌细胞系SW480高表达paxillin, 本课题通过研究下调paxillin高表达对SW480细胞多种信号转导通路及超微结构的影响, 以揭示paxillin高表达在结直肠癌发生发展中的作用及机制, 为临床分子靶向治疗提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 结直肠癌细胞系由北京大学第一医院外科实验室提供。DMEM培养基及胎牛血清购自美国Gibco公司。paxillin siRNA购自上海吉玛公司, 其中paxillin siRNA 1针对paxillin 545-565靶基因位点(GGGCAGCAACCTTTCTGAAGT), paxillin siRNA 2针对paxillin 782-802靶基因位点(GGAGAGTCTCTTGATGAAGT)。Western blot检测所用的抗体见图2。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养及转染:** SW480细胞培养于含100 mL/L胎牛血清, 100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养基中, 定期检测以防微生物污染。将SW480细胞置于37 °C、50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中传代培养, 实验细胞均处于对数生长期。当SW480细胞生长至80%-90%融合时, 按Lipofectamine 2000转染试剂说明书将空质粒(阴性对照)、paxillin siRNA 1和paxillin siRNA 2分别转染SW480细胞, 转染48 h后收集细胞, 利用G418抗性筛选稳定转染细胞, 得到3组稳定转染细胞系, 依次命名为: NC组、SW545组和SW782组。

**1.2.2 Western blot:** 依次收集SW480组、NC组、SW545组和SW782组4组细胞, 加入裂解缓冲液及蛋白酶、磷酸酶抑制剂, 充分裂解细胞15 min, 提取细胞总蛋白, Bradford分光光度法测定其蛋白质含量以确定上样量。以10%SDS-PAGE凝胶恒压电泳分离各组样品中的蛋白质, 利用恒电流电转将凝胶中的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 置入含5%脱脂奶粉的TBST溶液室温封闭

2 h, 加入以含5%脱脂奶粉的TBST溶液稀释的一抗4 °C孵育过夜。第2天以TBST洗膜10 min×3次, 置于二抗TBST稀释液中室温孵育1 h, 洗膜10 min×3次, 加入Amersham ECL prime发光液, 曝光、洗片、分析。

**1.2.3 超微结构观察:** 以0.25%胰酶消化贴壁细胞得到各组细胞的细胞悬液, 以0.1 mol/L PBS清洗细胞悬液, 1 000 r/min离心5 min, 弃去上清, 再次以0.1 mol/L PBS清洗, 1 500 r/min离心10 min, 小心弃去上清, 切勿扰动细胞团块, 在细胞团块中加入2 mL 0.1 mol/L的戊二醛, 置于4 °C 1 h以上。将几组样本送至电镜室制备切片, 透射电镜下观察。

## 2 结果

**2.1 paxillin及相关信号转导蛋白的表达和特异位点磷酸化水平** 各组细胞paxillin及相关信号转导蛋白的表达和特异位点磷酸化水平Western blot检测结果如图3所示。SW545细胞的paxillin高表达无明显变化, SW782细胞的paxillin高表达被显著下调, 同时SW782细胞paxillin(Tyr118)磷酸化水平也显著降低。SW782细胞ERK1/2的表达水平无明显变化, 但是ERK1/2(Thr202/Tyr204)磷酸化水平显著降低。SW782细胞AKT1/2/3及FAK的表达及特异位点磷酸化水平均无明显变化。结果提示SW782细胞paxillin高表达的下调伴随着paxillin磷酸化水平的下调及其下游ERK1/2信号转导通路活性的下调。

**2.2 超微结构观察** 由于paxillin的高表达无明显下调, SW545细胞未被用于超微结构观察。SW480组、NC组和SW782组细胞有相似的细胞异型性。与SW480细胞相比, NC组细胞无明显超微结构改变, 但是SW782细胞却发生了显著的超微结构变化。SW480细胞表面只有稀疏的微绒毛(图4A); SW782细胞表面具有大量的微绒毛(图4B)。SW480细胞内有大量的线粒体, 溶酶体少见(图4C); SW782细胞内线粒体少见, 有多量成簇聚集的溶酶体(图4D)。SW480细胞内难以看到微丝微管束; SW782细胞内有多量微丝微管束(图4E)。SW480细胞内畸形肿胀的线粒体多见(图4C, 4F)。

## 3 讨论

与SW480细胞相比, NC组细胞无明显超微结构改变, 但是SW782细胞却发生了显著的超微结构变化, 具有明显增多的微绒毛、微丝微管束



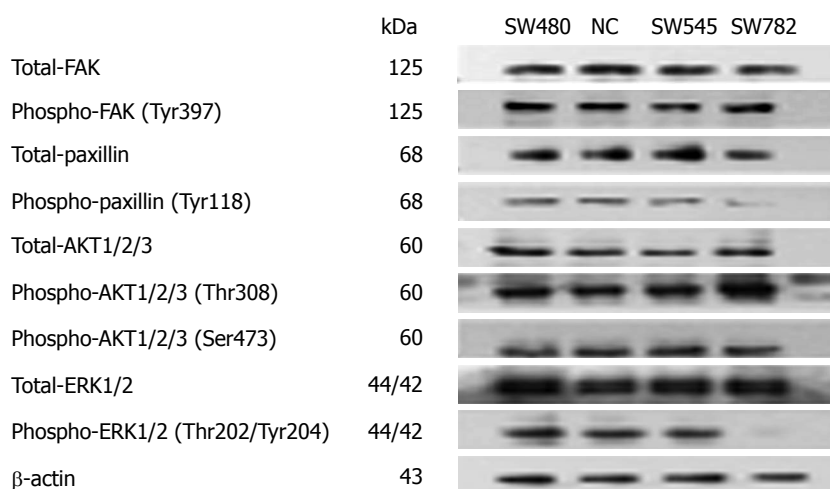


图 2 Western blot检测所用抗体.  $\beta$ -actin为Western blot检测内参. Western blot检测所使用的二抗均为山羊单抗.

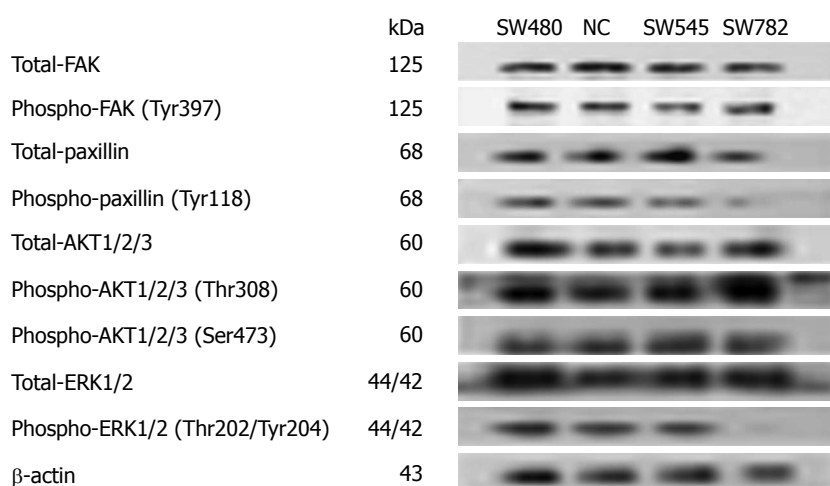


图 3 各组细胞paxillin及相关信号转导蛋白的表达和特异位点磷酸化水平Western blot检测结果.

#### ■创新盘点

本研究首先利用siRNA稳定转染高表达paxillin的结直肠癌细胞系SW480, 然后Western blot检测稳定转染细胞中paxillin、FAK、AKT1/2/3以及ERK1/2的表达及主要特异磷酸化位点的磷酸化水平, 结果发现在下调paxillin高表达的结直肠癌细胞中paxillin及ERK1/2的磷酸化水平也被显著下调, 提示paxillin高表达可能通过磷酸化激活paxillin及ERK1/2信号转导通路从而在结直肠癌发生发展中起着非常重要的作用.

与溶酶体以及明显减少的线粒体. 微绒毛、微丝微管束均是细胞骨架的重要组成部分, 细胞骨架能维持正常细胞的形态结构, 通过参与细胞信号转导和基因表达调控还能调节正常细胞的迁移、极性、侵袭、增殖和存活. 细胞骨架的这些调控作用在肿瘤细胞中往往出现紊乱, 从而导致肿瘤细胞增殖、变形、迁移和侵袭能力的变化<sup>[26-28]</sup>. SW480细胞中微丝微管束的减少, 也可以称之为细胞骨架的解体, 早已被作为肿瘤细胞恶性转化的明确标志<sup>[29]</sup>. 据报道, 肿瘤细胞不规则微绒毛的增多与肿瘤细胞的增殖和转移能力相关<sup>[30]</sup>, 这似乎与我们的实验结果相矛盾, 然而考虑到正常结直肠黏膜上皮细胞具有丰富的微绒毛, SW480细胞微绒毛的减少可能是结直肠黏膜上皮细胞恶性转化的表现之一, 或许能够解释这些看似矛盾的实验结果. 肿瘤生

物学界一个新兴主题就是肿瘤细胞能量代谢调节与肿瘤进展密切相关<sup>[31,32]</sup>. SW480细胞中大量而且往往是畸形肿胀的线粒体, 标志着SW480细胞能量代谢状态的转化和线粒体膜电势能的显著改变. 线粒体在肿瘤发生进展中发挥着重要作用, 肿瘤生物学界一个新兴主题就是肿瘤细胞能量代谢调节与肿瘤进展密切相关<sup>[31,32]</sup>. 值得注意的是, 线粒体和溶酶体均是与细胞凋亡调控有关的重要细胞器. 能够逃逸细胞凋亡是恶性肿瘤细胞的重要标志, 而正常细胞凋亡途径的抑制是肿瘤发生的必要机制<sup>[33]</sup>. 涉及线粒体的内源性凋亡途径为防止癌变提供了重要保障, 而内源性凋亡途径的缺陷在肿瘤转移和化疗耐药中发挥重要的作用<sup>[34,35]</sup>. 此外, 细胞凋亡也可以通过细胞表面的肿瘤坏死因子家族的死亡受体激活触发的, 称为外源性细胞凋亡途径. 不像

### ■同行评价

本文通过siRNA技术下调大肠癌细胞SW480中paxillin的表达水平,从而观察癌细胞的超微结构特征以及可能的分子机制,具有一定的创新性和临床价值。

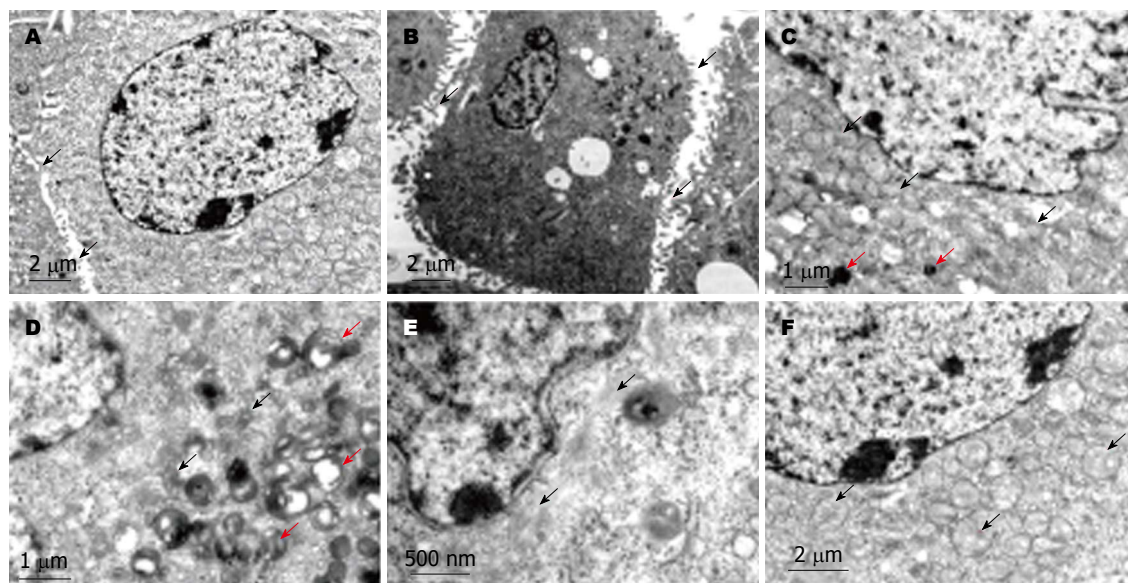


图4 SW782细胞的超微结构变化. A: SW480细胞表面只有稀疏的微绒毛(箭头). B: SW782细胞表面具有大量的微绒毛(箭头). C: SW480细胞内有大量的线粒体(箭头),溶酶体少见(红箭头). D: SW782细胞内线粒体少见(箭头),有多量成簇聚集的溶酶体(红箭头). E: SW782细胞内有多量微丝微管束(箭头). F: SW480细胞内畸形肿胀的线粒体多见(箭头).

前述两种典型的凋亡途径需要有半胱天冬酶的激活<sup>[36,37]</sup>,溶酶体细胞死亡途径是以溶酶体的高通透性及蛋白酶继而易位进入细胞质激活凋亡为特征的,他可以在肿瘤细胞的经典凋亡途径均存在各种缺陷时发挥替代作用<sup>[38]</sup>.因此线粒体及溶酶体数目与形态的变化,提示SW480细胞存在线粒体及溶酶体的功能异常,可能借助上述机制逃逸细胞凋亡.综上所述,paxillin高表达的SW480细胞中细胞骨架的解体以及线粒体增多、畸形肿胀和溶酶体的减少等超微结构改变符合恶性转化细胞的特征,通过下调SW480细胞的paxillin高表达能够逆转这种恶性转化超微结构特征.

Western blot检测结果提示SW782细胞paxillin高表达的下调伴随着paxillin磷酸化水平的下调及其下游ERK1/2信号转导通路活性的下调.这一发现提示paxillin高表达可能通过磷酸化激活paxillin及ERK1/2信号转导通路从而在结直肠癌发生发展中起着非常重要的作用. Rho家族小GTP酶蛋白负责细胞微丝骨架的调节,而paxillin对这一调节过程中的时空协调发挥着核心作用.通过抑制Rho信号转导,ERK1/2信号转导途径的激活可导致恶性转化细胞的微丝骨架解体,进而通过肌动蛋白动力学的改变和细胞黏附能力的下降导致细胞迁移能力的增强<sup>[40]</sup>. Paxillin能通过其LD结构域与微管骨架相结合,可能有助于微管组织中心的重新定位<sup>[41]</sup>,而ERK1/2的激

活可导致微管的去稳定<sup>[42]</sup>.激活的ERK1/2可以与微管结合并直接调节其动力学<sup>[43]</sup>或通过影响微管相关蛋白的磷酸化<sup>[44]</sup>来调节微管的动力学.因此,paxillin和下游ERK1/2信号通路的激活或许能够解释SW480细胞微丝、微管细胞骨架解体.线粒体的数量调控需要染色体DNA与线粒体DNA的协调转录和高能量利用区域的产生及线粒体的定向转运<sup>[10]</sup>.在细胞核内,激活ERK1/2可以调节基因的表达,影响多种线粒体蛋白的表达,进而影响线粒体的诸多功能<sup>[45]</sup>.深入研究证实线粒体内存在激活的ERK1/2,提示激活的ERK1/2可能影响许多线粒体本身的功能,例如线粒体依赖的细胞生存/凋亡调控<sup>[46]</sup>、调节线粒体膜电势能和ATP的生成<sup>[47]</sup>以及调节线粒体基因的表达<sup>[11]</sup>.而且,依赖paxillin和ERK1/2调控的细胞骨架系统还负责线粒体等细胞器和囊泡的细胞内转运<sup>[48]</sup>.尽管目前对于paxillin的表达和活化与线粒体的变化之间的关系所知甚少,paxillin和ERK1/2信号转导通路的激活或许也能够解释SW480细胞线粒体超微结构的变化.如同线粒体等细胞器,溶酶体的运动也依赖于细胞微丝和微管骨架<sup>[48,49]</sup>.微丝还参与内涵体和溶酶体的稳态分布的维护以及这两种细胞器之间的膜转运<sup>[50,51]</sup>.由于paxillin和ERK1/2信号转导通路负责细胞骨架系统的调控,paxillin和ERK1/2信号转导通路必然能够影响溶酶体的功能.如上所述,激活的ERK1/2也可能通过激活胞浆中

和包括溶酶体在内的各种细胞器中的多种底物, 影响溶酶体的生成和功能, paxillin也能通过与ERK1/2相互作用在基因表达调节中发挥着重要作用. 因此paxillin和ERK1/2信号转导通路的激活会影响溶酶体的数目和功能, 这也能够解释SW480细胞溶酶体超微结构改变.

总之, 通过阻断paxillin高表达能够逆转结直肠癌细胞系SW480的典型恶性转化细胞的超微结构特征; paxillin高表达可能通过磷酸化激活paxillin及ERK1/2信号转导通路从而在结直肠癌发生发展中起着非常重要的作用. 尽管详细机制尚未明了, 这些有意义的发现揭示了paxillin高表达以及ERK1/2等信号转导通路在结直肠癌发生发展中的重要作用, 提供了进一步深入研究的方向, 将来或许能够为结直肠癌临床治疗找到新的治疗靶点.

#### 4 参考文献

- Jenq W, Cooper DR, Ramirez G. Integrin expression on cell adhesion function and up-regulation of P125FAK and paxillin in metastatic renal carcinoma cells. *Connect Tissue Res* 1996; 34: 161-174 [PMID: 9023046 DOI: 10.3109/03008209609000696]
- Azuma K, Tanaka M, Uekita T, Inoue S, Yokota J, Ouchi Y, Sakai R. Tyrosine phosphorylation of paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene* 2005; 24: 4754-4764 [PMID: 15870699 DOI: 10.1038/sj.onc.1208654]
- Tremblay L, Hauck W, Aprikian AG, Begin LR, Chapdelaine A, Chevalier S. Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma. *Int J Cancer* 1996; 68: 164-171 [PMID: 8900422 DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19961009)68:2<169::AID-IJC4>3.0.CO;2-W]
- Deakin NO, Turner CE. Paxillin comes of age. *J Cell Sci* 2008; 121: 2435-2444 [PMID: 18650496 DOI: 10.1242/jcs.018044]
- Scheswohl DM, Harrell JR, Rajfur Z, Gao G, Campbell SL, Schaller MD. Multiple paxillin binding sites regulate FAK function. *J Mol Signal* 2008; 3: 1 [PMID: 18171471 DOI: 10.1186/1750-2187-3-1]
- Bolós V, Gasent JM, López-Tarruella S, Grande E. The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *Onco Targets Ther* 2010; 3: 83-97 [PMID: 20616959 DOI: 10.2147/OTT.S6909]
- Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 35-49 [PMID: 19169797 DOI: 10.1007/s10555-008-9165-4]
- Bellis SL, Miller JT, Turner CE. Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 1995; 270: 17437-17441 [PMID: 7615549 DOI: 10.1074/jbc.270.29.17437]
- Schaller MD, Parsons JT. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2635-2645 [PMID: 7537852]
- Wortzel I, Seger R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* 2011; 2: 195-209 [PMID: 21779493 DOI: 10.1177/1947601911407328]
- Galli S, Jahn O, Hitt R, Hesse D, Opitz L, Plessmann U, Urlaub H, Poderoso JJ, Jares-Erijman EA, Jovin TM. A new paradigm for MAPK: structural interactions of hERK1 with mitochondria in HeLa cells. *PLoS One* 2009; 4: e7541 [PMID: 19847302 DOI: 10.1371/journal.pone.0007541]
- Teis D, Taub N, Kurzbauer R, Hilber D, de Araujo ME, Erlacher M, Offterdinger M, Villunger A, Geley S, Bohn G, Klein C, Hess MW, Huber LA. p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. *J Cell Biol* 2006; 175: 861-868 [PMID: 17178906 DOI: 10.1083/jcb.200607025]
- Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Dev Cell* 2004; 7: 33-44 [PMID: 15239952 DOI: 10.1016/j.devcel.2004.05.019]
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22: 153-183 [PMID: 11294822 DOI: 10.1210/er.22.2.153]
- Rubinfeld H, Seger R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol* 2005; 31: 151-174 [PMID: 16170216 DOI: 10.1385/MB:31:2:151]
- Ishibe S, Joly D, Zhu X, Cantley LG. Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Mol Cell* 2003; 12: 1275-1285 [PMID: 14636584 DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00406-4]
- Woods AJ, Roberts MS, Choudhary J, Barry ST, Mazaki Y, Sabe H, Morley SJ, Critchley DR, Norman JC. Paxillin associates with poly(A)-binding protein 1 at the dense endoplasmic reticulum and the leading edge of migrating cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 6428-6437 [PMID: 11704675]
- Lewis JM, Baskaran R, Taagepera S, Schwartz MA, Wang JY. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 15174-15179 [PMID: 8986783 DOI: 10.1073/pnas.93.26.15174]
- Sen A, De Castro I, Defranco DB, Deng FM, Melamed J, Kapur P, Raj GV, Rossi R, Hammes SR. Paxillin mediates extranuclear and intranuclear signaling in prostate cancer proliferation. *J Clin Invest* 2012; 122: 2469-2481 [PMID: 22684108 DOI: 10.1172/JCI62044]
- Reiske HR, Kao SC, Cary LA, Guan JL, Lai JF, Chen HC. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274: 12361-12366 [PMID: 10212207]
- Toker A, Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 2000; 275: 8271-8274 [PMID: 10722653 DOI: 10.1074/jbc.275.12.8271]
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307: 1098-1101 [PMID: 15718470 DOI: 10.1126/science.1106148]
- Aksamitiene E, Kiyatkin A, Kholodenko BN. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans* 2012; 40: 139-146 [PMID: 22260680 DOI: 10.1042/BST20110609]
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev*



- Cancer* 2002; 2: 489-501 [PMID: 12094235]
- 25 Larue L, Bellacosa A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 2005; 24: 7443-7454 [PMID: 16288291 DOI: 10.1038/sj.onc.1209091]
  - 26 Lindberg U, Karlsson R, Lassing I, Schutt CE, Höglund AS. The microfilament system and malignancy. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 2-11 [PMID: 18024149 DOI: 10.1016/j.semcancer.2007.10.002]
  - 27 Royer C, Lu X. Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer? *Cell Death Differ* 2011; 18: 1470-1477 [PMID: 21617693 DOI: 10.1038/cdd.2011.60]
  - 28 Stevenson RP, Veltman D, Machesky LM. Actin-bundling proteins in cancer progression at a glance. *J Cell Sci* 2012; 125: 1073-1079 [PMID: 22492983 DOI: 10.1242/jcs.093799]
  - 29 Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773: 642-652 [PMID: 16926057]
  - 30 Ren J, Hamada J, Okada F, Takeichi N, Morikawa K, Hosokawa M, Kobayashi H. Correlation between the presence of microvilli and the growth or metastatic potential of tumor cells. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 920-926 [PMID: 1977729 DOI: 10.1111/j.1349-7006.1990.tb02668.x]
  - 31 Muñoz-Pinedo C, El Mjiyad N, Ricci JE. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis* 2012; 3: e248 [PMID: 22237205 DOI: 10.1038/cddis.2011.123]
  - 32 Pokorný J, Jandová A, Nedbalová M, Jelínek F, Cifra M, Kučera O, Havelka D, Vrba J, Vrba J, Coček A, Kobilková J. Mitochondrial metabolism - neglected link of cancer transformation and treatment. *Prague Med Rep* 2012; 113: 81-94 [PMID: 22691280]
  - 33 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70 [PMID: 10647931 DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9]
  - 34 Kitada S, Pedersen IM, Schimmer AD, Reed JC. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 2002; 21: 3459-3474 [PMID: 12032782 DOI: 10.1038/sj.onc.1205327]
  - 35 Kirkin V, Joos S, Zörnig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 229-249 [PMID: 14996506 DOI: 10.1016/j.bbamcr.2003.08.009]
  - 36 Fogg VC, Lanning NJ, MacKeigan JP. Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chin J Cancer* 2011; 30: 526-539 [PMID: 21801601 DOI: 10.5732/cjc.011.10018]
  - 37 Kirkegaard T, Jäättelä M. Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 746-754 [PMID: 18948147]
  - 38 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646-674 [PMID: 21376230 DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013]
  - 39 Groth-Pedersen L, Aits S, Corcelle-Termeau E, Petersen NH, Nylandsted J, Jäättelä M. Identification of cytoskeleton-associated proteins essential for lysosomal stability and survival of human cancer cells. *PLoS One* 2012; 7: e45381 [PMID: 23071517]
  - 40 Barros JC, Marshall CJ. Activation of either ERK1/2 or ERK5 MAP kinase pathways can lead to disruption of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2005; 118: 1663-1671 [PMID: 15797923 DOI: 10.1242/jcs.02308]
  - 41 Robertson LK, Ostergaard HL. Paxillin associates with the microtubule cytoskeleton and the immunological synapse of CTL through its leucine-aspartic acid domains and contributes to microtubule organizing center reorientation. *J Immunol* 2011; 187: 5824-5833 [PMID: 22043013 DOI: 10.4049/jimmunol.1003690]
  - 42 Asrih M, Pellieux C, Papageorgiou I, Lerch R, Montessuit C. Role of ERK1/2 activation in microtubule stabilization and glucose transport in cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301: E836-E843 [PMID: 21771966 DOI: 10.1152/ajpendo.00160.2011]
  - 43 Reszka AA, Seger R, Diltz CD, Krebs EG, Fischer EH. Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 8881-8885 [PMID: 7568036]
  - 44 Morishima-Kawashima M, Kosik KS. The pool of map kinase associated with microtubules is small but constitutively active. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 893-905 [PMID: 8816996]
  - 45 Seger R, Hanoch T, Rosenberg R, Dantes A, Merz WE, Strauss JF, Amsterdam A. The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *J Biol Chem* 2001; 276: 13957-13964 [PMID: 11278318]
  - 46 Lee HJ, Bach JH, Chae HS, Lee SH, Joo WS, Choi SH, Kim KY, Lee WB, Kim SS. Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase attenuates 3-hydroxykynurenine-induced neuronal cell death. *J Neurochem* 2004; 88: 647-656 [PMID: 14720214]
  - 47 Monick MM, Powers LS, Barrett CW, Hinde S, Ashare A, Groskreutz DJ, Nyunoya T, Coleman M, Spitz DR, Hunninghake GW. Constitutive ERK MAPK activity regulates macrophage ATP production and mitochondrial integrity. *J Immunol* 2008; 180: 7485-7496 [PMID: 18490749]
  - 48 Cordonnier MN, Dauzonne D, Louvard D, Coudrier E. Actin filaments and myosin I alpha cooperate with microtubules for the movement of lysosomes. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 4013-4029 [PMID: 11739797]
  - 49 Matteoni R, Kreis TE. Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J Cell Biol* 1987; 105: 1253-1265 [PMID: 3308906 DOI: 10.1083/jcb.105.3.1253]
  - 50 van Deurs B, Holm PK, Kayser L, Sandvig K. Delivery to lysosomes in the human carcinoma cell line HEp-2 involves an actin filament-facilitated fusion between mature endosomes and preexisting lysosomes. *Eur J Cell Biol* 1995; 66: 309-323 [PMID: 7544728]
  - 51 Durrbach A, Louvard D, Coudrier E. Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 2): 457-465 [PMID: 8838669]

编辑 李军亮 电编 鲁亚静



# 启动子区甲基化对肝细胞癌锌指蛋白331表达的调控

杨志华, 郭明洲, 李鑫, 毛高平

杨志华, 安徽医科大学研究生院 安徽省合肥市 230032  
郭明洲, 李鑫, 中国人民解放军总医院消化内科 北京市 100853  
毛高平, 中国人民解放军空军总医院消化内科 北京市 100142  
杨志华, 主要从事消化系统肿瘤的临床与基础研究。  
作者贡献分布: 本课题由毛高平与郭明洲设计; 郭明洲指导实验操作; 杨志华负责实验操作、资料收集、数据整理及撰写论文; 李鑫参与细胞培养、DNA及RNA的提取; 文章的修改与审校由毛高平与郭明洲完成。  
通讯作者: 毛高平, 教授, 主任医师, 100142, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院消化内科。  
maogaoping@medmail.com.cn  
电话: 010-68410099-6232  
收稿日期: 2013-01-30 修回日期: 2013-02-06  
接受日期: 2013-03-05 在线出版日期: 2013-03-28

## Zinc-finger protein 331 expression is regulated by promoter region hypermethylation in hepatocellular carcinoma

Zhi-Hua Yang, Ming-Zhou Guo, Xin Li, Gao-Ping Mao

Zhi-Hua Yang, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China  
Ming-Zhou Guo, Xin Li, Department of Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China  
Gao-Ping Mao, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital, Chinese PLA, Beijing 100142, China  
Correspondence to: Gao-Ping Mao, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital, Chinese PLA, Beijing 100142, China. maogaoping@medmail.com.cn  
Received: 2013-01-30 Revised: 2013-02-06  
Accepted: 2013-03-05 Published online: 2013-03-28

### Abstract

**AIM:** To analyze the methylation status and the expression regulation of zinc-finger protein 331 (ZNF331) in hepatocellular carcinoma.

**METHODS:** Five human hepatic cancer cell lines and 50 specimens of human primary hepatic cancer were employed to detect ZNF331 promoter region methylation by methylation specific PCR (MSP). Semi-quantitative RT-PCR was used to examine the expression of ZNF331.

**RESULTS:** Partial methylation was found in HBXF344, PLC/PRF/5, HepG2 and BEL-7402

cell lines. Methylation was not detected in SNU449 cell line. Weak expression of ZNF331 was found in HBXF344, PLC/PRF/5, HepG2 and BEL-7402 cell lines. ZNF331 was moderately expressed in SNU449 cell line. Increased expression of ZNF331 was found in HBXF344, HepG2, BEL-7402, and PLC/PRF/5 cell lines after 5-Aza treatment. No significant change was examined in ZNF331 expression in SNU449 cell line before and after 5-Aza treatment. ZNF331 was methylated in 80% (40/50) of primary human hepatic cancer specimens, but methylation was not detectable in normal liver tissue specimens (0/10). No correlation was found between promoter region methylation and gender, age, AFP level, hepatitis virus infection, tumor size or tumor stage.

**CONCLUSION:** ZNF331 expression is silenced by promoter region hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. ZNF331 is frequently methylated in human primary hepatic cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; DNA methylation; ZNF331 gene; Methylation-specific PCR

Yang ZH, Guo MZ, Li X, Mao GP. Zinc-finger protein 331 expression is regulated by promoter region hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 761-765 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/761.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.761>

### 摘要

**目的:** 探讨启动子区甲基化对肝细胞癌中锌指蛋白331(ZNF331)表达的调控及意义。

**方法:** 采用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)检测ZNF331在肝癌细胞系和50例原发性肝细胞癌组织中的甲基化状况, 并采用半定量RT-PCR分析5-杂氮-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza)处理前后肝癌细胞系中ZNF331的表达情况。

**结果:** ZNF331在肝癌细胞系HBXF344、

### ■背景资料

表观遗传学是指在DNA序列不变的基础上, 基因表达的可遗传性改变, 包括DNA甲基化、组蛋白修饰、microRNA调控及染色体修饰等方式。肿瘤相关基因启动子区的异常高甲基化造成基因表达失活, 导致正常细胞的生长分化调控失常是肿瘤发生发展的关键, 这种异常改变多发生在肿瘤恶变早期。

### ■同行评议者

姚鹏, 副教授, 北京军区总医院全军肝病中心; 虞必光, 教授, 遵义医学院附属医院消化科

## ■研究前沿

随着表观遗传学的发展, DNA甲基化与肿瘤的关系成为研究的热点. 大量研究表明, 肿瘤发生发展过程中存在某些特异性的异常甲基化, 可作为肿瘤早期诊断及预后监测的分子生物学标志.

PLC/PRF/5、HepG2、BEL-7402中低表达, SNU449中表达正常. 5-Aza处理后HBXF344、HepG2、BEL-7402及PLC/PRF/5中ZNF331恢复表达. 50例原发性肝细胞癌标本中, ZNF331启动子区的甲基化率为80%(40/50), 而10例正常肝脏组织中ZNF331均无甲基化. ZNF331启动子区的甲基化与肝细胞癌患者的性别、年龄、肿瘤直径大小、血清甲胎蛋白值、肝炎病毒感染、分化水平及TNM分期均无关联( $P>0.05$ ).

**结论:** ZNF331启动子区高甲基化是肝癌的频发事件, ZNF331基因表达受启动子区甲基化调控.

© 2013年版权归Baishideng所有.

**关键词:** 肝细胞癌; DNA甲基化; ZNF331基因; 甲基化特异性PCR

杨志华, 郭明洲, 李鑫, 毛高平. 启动子区甲基化对肝细胞癌锌指蛋白331表达的调控. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 761-765 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/761.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.761>

## 0 引言

肝癌的发病率居恶性肿瘤的前列, 且呈逐年递增的趋势; 其预后差、病死率高, 临床危害严重. 目前手术、放疗等治疗并未明显改善肝癌患者的预后, 因此, 临床急需进一步寻求新的治疗手段. 研究发现: 遗传调控和表观遗传调控紊乱导致基因异常表达及功能失调参与肿瘤的发生<sup>[1-3]</sup>. 其中, 抑癌基因启动子区的甲基化起着至关重要的作用<sup>[4-6]</sup>. 有别于经典遗传学, 表观遗传学的改变是可逆的, 这使其成为治疗疾病的潜在靶点<sup>[7]</sup>. 同时, 研究证实<sup>[8]</sup>: DNA异常甲基化在肿瘤形成过程中是可逆的, 这也为从表观遗传学角度治疗肿瘤提供了理论依据. 研究证实<sup>[9-11]</sup>: 锌指蛋白家族成员-锌指蛋白331(ZNF331)在胃癌和多发性骨髓瘤中具有抑癌作用. 而研究其在肝细胞癌的报道鲜见. 我们研究ZNF331在肝细胞癌发生发展中表观遗传学的变化, 以了解表观遗传学在肝细胞癌发生发展中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 50例肝细胞癌组织标本来源于随机选取的2011-2012年间中国人民解放军总医院收治的50例肝细胞癌患者. 其中男37例, 女13例, 中位年龄52.3(17-79)岁, 术前均未经放疗、化疗及

免疫治疗. TNM分期 I-II期21例, III-IV期29例. 获取的新鲜标本一部分用10%甲醛溶液固定后送做病理检验, 另一部分迅速冻存于液氮, 之后迅速转存于-80℃冰箱. 10例肝正常组织来自于肝囊肿手术患者.

5株肝癌细胞系: SNU449、HBXF344、PLC/PRF/5、HepG2、BEL-7402, 均为中国人民解放军总医院消化科实验室已建立的人肝癌细胞株. 胎牛血清(FBS)及RPMI-1640培养基购自GIBCO公司; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dC)购自Sigma公司; TRIzol试剂盒及cDNA第一链合成试剂盒购自Invitrogen公司; DNA纯化试剂盒购自Promega公司; PCR引物均由华大基因公司合成. 细胞培养箱(MCO-20AIC型)和超低温冰箱由日本Sanyo公司生产; 超净工作台(Bcl-1360型)由北京亚泰科隆仪器公司生产; 倒置显微镜(CKX41型)由日本Olympus公司生产; 凝胶电泳仪(DYY-8C型)由北京六一仪器公司生产; 循环水式多用真空泵(SHB-III型)由郑州长城科工贸有限公司生产; 高速冷冻离心机(HC-2518R型)由科大创新中佳分公司生产.

**1.2 方法** 采用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)和半定量RT-PCR技术检测肝癌细胞系中ZNF331启动子区甲基化与基因表达情况, 并用甲基化酶抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza)处理肝癌细胞系, 比较药物处理前后ZNF331 mRNA的表达, 以确定ZNF331基因的表达是否受启动子区甲基化调控, 具体步骤如下.

**1.2.1 细胞培养和5-Aza处理:** 5株肝癌细胞均为贴壁细胞, 均用含10%小牛血清和1%青霉素-链霉素的RMPI 1640培养基培养. 根据不同细胞的生长速度, 取对数生长期细胞按照10%-20%融合度分别接种于75 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 每株细胞接种2瓶, 为加药组和未处理组. 待细胞贴壁后, 加药组用含5-Aza(2 μmol/L)的上述培养基培养, 每24 h更换1次培养基, 96 h后提取总RNA. 未处理组每24 h更换培养基1次, 在细胞融合度达70%左右提取总RNA. 培养环境37℃, 5%CO<sub>2</sub>.

**1.2.2 DNA和RNA的提取:** 肝细胞癌组织和细胞的DNA用蛋白酶K法提取, 用TRIzol试剂盒提取细胞总RNA, 提取的DNA和RNA用紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量, DNA保存于-20℃, RNA保存于-80℃备用.

**1.2.3 DNA亚硫酸氢盐修饰:** 参照文献[9]对基因

## ■创新盘点

ZNF331是新近发现的一个抑癌基因. 研究表明其能够抑制胃癌的生长, 但在肝细胞癌中的未见相关报道. 本文研究ZNF331在正常肝组织、肝癌组织和肝癌细胞系的甲基化情况及ZNF331甲基化对ZNF331表达影响.



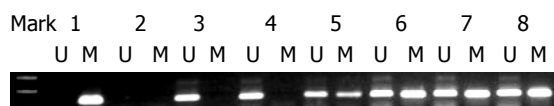


图 1 5株肝癌细胞系ZNF331基因启动子区甲基化特异性PCR分析结果。1: 甲基化阳性对照; 2: 为阴性对照; 3: 非甲基化对照; 4-8: 5个肝癌细胞系依次是SNU449, HBXF344, PLC/PRF/5, HepG2和BEL-7402; U: 非甲基化条带; M: 甲基化条带。

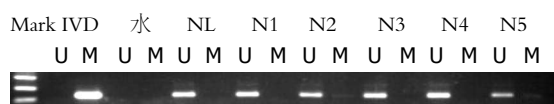


图 2 部分正常肝组织ZNF331基因启动子区甲基化特异性PCR分析结果。IVD: 甲基化阳性对照; 水: 为阴性对照, NL: 非甲基化对照; N1-N5为5例正常肝组织; U: 非甲基化条带; M: 甲基化条带。

组DNA进行亚硫酸氢盐修饰, 用DNA纯化试剂盒纯化回收DNA, 修饰后DNA作为MSP扩增的模板(即刻使用或保存于-20℃备用)。

1.2.4 甲基化特异性PCR(MSP)扩增: 设计ZNF331的特异性甲基化引物(ZNF331-M)和特异性非甲基化引物(ZNF331-U): (1)ZNF331-M: 上游5'-TAAGGTAGGACGTTTTTAGGGTCGC-3', 下游5'-AACTCTACACGACGCAAATAAAACCG-3', 产物为147 bp; (2)ZNF331-U: 上游5'-TTTTAAGGTAGGATGTTTTTAGGGTTGT-3', 下游5'-ACAACCTCTACACAACACAAATAAAACCA-3', 产物为152 bp。对亚硫酸盐修饰后的DNA样本进行PCR扩增。以IVD(*in vitro* methylated DNA)作为甲基化阳性对照, 以ZNF331非甲基化的人外周血淋巴细胞提取的DNA作为非甲基化对照, 以去离子水作为阴性对照。

1.2.5 MSP产物分析: 取10 μL PCR产物于2.0%的琼脂糖凝胶, 130 V电泳约25 min。判定标准: 若ZNF331-M引物扩增出147 bp条带, 而ZNF331-U引物未扩增出条带, 则说明ZNF331基因启动子区发生了完全甲基化; 如ZNF331-M引物未扩增出条带, 而ZNF331-U引物扩增出152 bp条带, 即说明未发生甲基化; 如果两种引物均扩增出相应大小的目的条带, 说明存在部分甲基化。

1.2.6 RT-PCR检测ZNF331 mRNA的表达: 以提取的总RNA为模板, 按照反转录第一链cDNA合成试剂盒说明逐步进行cDNA的合成。ZNF331基因引物设计: 上游5'-TAGGTCAGCTCTAGCCTCTC-3', 下游5'-AGCGTACCTTCACATATCCAG-3', 产物为347 bp。以水作为阴性对



图 3 部分肝癌组织ZNF331基因启动子区甲基化特异性PCR分析结果。IVD: 甲基化阳性对照; 水: 为阴性对照; NL: 非甲基化对照; T1-T5为5例肝癌组织。

照, 同时以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因。PCR产物用2.0%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶图像处理系统观察、拍照并分析ZNF331基因mRNA的表达水平。

统计学处理 采用SPSS17.0软件包进行统计分析, 计数资料采用 $\chi^2$ 、校正 $\chi^2$ 或Fisher确切概率法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 MSP检测结果 5株肝癌细胞系中ZNF331启动子区甲基化率为83.3%(5/6), HBXF344、PLC/PRF/5、HepG2和BEL-7402表现为部分甲基化, 而SNU449为非甲基化(图1); 10例正常肝组织中均未检测到甲基化(图2); 50例HCC组织中ZNF331基因甲基化率为80%(图3), 其中10例呈完全甲基化、30例呈半甲基化状态。

2.2 启动子区甲基化对ZNF331基因表达的调控 5株肝癌细胞系, 5-Aza药物处理前后, SNU449细胞系中ZNF331表达无明显变化, 而余细胞系加药处理后ZNF331明显高表达(图4)。结果提示ZNF331基因表达受启动子区甲基化调控。

2.3 肝癌患者的临床指标与ZNF331基因启动子区甲基化关系 由表1可知, ZNF331基因启动子区甲基化水平与患者的性别、年龄、肿瘤直径大小、甲胎蛋白水平、乙型肝炎和/或丙型肝炎病毒感染、肿瘤分化水平及TNM分期均无相关性( $P$ 均 $>0.05$ )。

## 3 讨论

表观遗传学是指不伴有基因序列改变的、可遗传的基因表达改变<sup>[10]</sup>。研究证实<sup>[12,13]</sup>: DNA甲基化和组蛋白修饰等表观遗传学改变在肝癌发生发展过程中发挥着重要的作用。DNA甲基化作为表观遗传调控的重要机制之一, 主要调控靶基因的转录, 在肿瘤细胞分化和增殖中发挥重要的作用<sup>[14]</sup>。甲基化沉默的抑癌基因已成为目前肝癌机制研究的热点。研究发现<sup>[15-18]</sup>: LIFR、APC、sall3及miR-335等抑癌基因均因启动子区高甲基化导致其低表达, 且与肝癌的发生密切相关。而肿瘤相关基因的甲基化是肝癌发生过

## ■应用要点

本研究有助于明确肝细胞癌中ZNF331的甲基化状况, 为临床肝癌的早期诊断提供分子生物学标志奠定理论基础。进一步研究ZNF331在肝癌发展中的作用, 为肝细胞癌分子靶向治疗提供理论支持。从而可能使肝癌患者摆脱目前的临床早期诊断及治疗困境。

## ■名词解释

锌指蛋白: 一类具有手指状结构域的转录因子, 其在胚胎发育、细胞分化、细胞转化及细胞周期的调控中发挥重要功能, 并随时间和空间的不同进行特异表达。

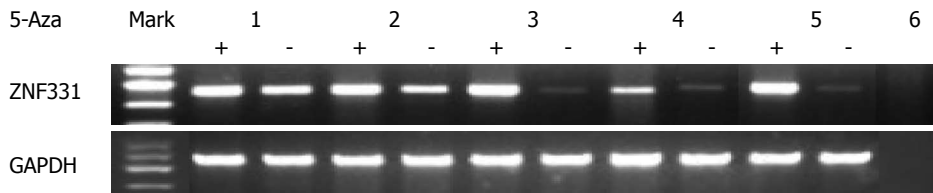


图4 甲基化抑制剂5-Aza处理前后肝癌细胞系中ZNF331表达的变化. 1-5: 5个肝癌细胞系依次是SNU449、HBXF344、HepG2、BEL-7402和PLC/PRF/5; 6(水): 阴性对照. ZNF331: 锌指蛋白331; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; +: 加5-Aza处理; -: 未加5-Aza处理.

表1 锌指蛋白331(ZNF331)基因启动子区甲基化与肝癌患者临床指征的关系

病理特征	n	甲基化	$\chi^2$ 值	P值
性别			0.526	0.468
男	37	31		
女	13	9		
年龄(岁)			0.052	0.820
≤50	16	12		
>50	34	28		
肿瘤直径大小(cm)			0.130	0.718
≤5	20	15		
>5	30	25		
甲胎蛋白(ng/mL)			1.048	0.306
≤200	36	27		
>200	14	13		
病毒感染			0.526	0.468
HBV和/或HCV	37	31		
无HBV和HCV	13	9		
分化水平			3.125	0.077
高	5	2		
中、低	45	38		
TNM分期			0.867	0.352
I-II	21	15		
III-IV	29	25		

程中频发的早期事件, 因此可以通过甲基化标志物检测进行肝癌的早期诊断. 本研究结果发现: 肝细胞癌中ZNF331启动子区甲基化率高达80%, 这提示ZNF331启动子区高甲基化在肝癌发生发展中较为普遍, 可作为临床对肝癌早期检测的理想候选指标.

ZNF331(又称ZNF361、ZNF463及RITA), 定位于染色体19q13, 是由Kruppel相关盒(Kruppel-associated box, KRAB)结构域和12个重复串联的C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>锌指结构域构成的锌指蛋白基因, 因其含KRAB结构域故被称为KRAB型锌指蛋白. KZNF(KRAB-containing zinc finger protein)是锌指类转录因子中最为庞大的一类<sup>[19]</sup>. KRAB结构域通过募集组蛋白甲基化酶、组蛋白去乙酰化酶复合物及异染色质蛋白等使靶基因沉默. 因

此, KRAB-ZF常作为转录抑制因子发挥作用, 与核仁的维持、细胞增殖、分化、凋亡以及细胞的恶性转化等密切相关. ZNF331参与精子的形成, 在胚胎发育、细胞增殖、分化、凋亡及调控细胞内信号传导等多种细胞生物学行为中起着重要的作用<sup>[20-22]</sup>. ZNF331抑制肿瘤生长主要是通过间接活化p53信号通路抑制细胞增殖, 诱导凋亡<sup>[23,24]</sup>.

目前, ZNF331在肝癌的相关研究未见报道. 本研究发现: 肝癌细胞系与肝癌组织中ZNF331基因启动子区甲基化率明显高于正常肝组织. ZNF331基因启动子区高甲基化在肝癌中普遍发生, 这表明ZNF331甲基化可能成为肝癌的早期诊断标志物. 我们应用甲基化酶抑制剂5-Aza, 降低甲基化水平, 结果显示: 肝癌细胞系ZNF331基因恢复其正常表达, ZNF331表达受甲基化调控. 这提示ZNF331基因在转录水平因启动子区高甲基化导致表达失活, 在肝癌的发生发展中可能发挥着重要的作用. 目前, 基因甲基化与肝炎病毒感染等临床病理特征是否有确切的相关性尚存争议, 本研究发现: ZNF331甲基化与患者的性别、年龄、甲胎蛋白水平、乙肝病毒感染、肿瘤TNM分期、分化水平及直径大小等无相关性 ( $P>0.05$ ).

总之, 本研究显示ZNF331启动子区甲基化与肝癌的发生密切相关, 可能作为肝癌诊断的标志物, 并为进一步认识肝癌的发病机制奠定了基础. 后期实验可进一步行ZNF331在肝细胞癌中的功能研究, 以明确其在肝癌发生发展中的作用及在肝细胞癌中是否发挥抑癌作用, 从而为肝细胞癌的表现遗传分子靶向治疗奠定理论基础.

## 4 参考文献

- 1 Dumitrescu RG. Epigenetic targets in cancer epidemiology. *Methods Mol Biol* 2009; 471: 457-467 [PMID: 19109794 DOI: 10.1007/978-1-59745-416-2\_23]
- 2 Piperi C, Vlastos F, Farmaki E, Martinet N, Papavasiliou AG. Epigenetic effects of lung cancer predisposing factors impact on clinical diagnosis and

- prognosis. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 1495-1501 [PMID: 18363846 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00309.x]
- 3 Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-692 [PMID: 17320506 DOI: 10.1016/j.cell.2007.01.029]
  - 4 Chen YL, Ko CJ, Lin PY, Chuang WL, Hsu CC, Chu PY, Pai MY, Chang CC, Kuo MH, Chu YR, Tung CH, Huang TH, Leu YW, Hsiao SH. Clustered DNA methylation changes in polycomb target genes in early-stage liver cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 425: 290-296 [PMID: 22842566 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.084]
  - 5 Zhao C, Bu X. Promoter methylation of tumor-related genes in gastric carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2012; 27: 1271-1282 [PMID: 22936446]
  - 6 Mao J, Yu H, Wang C, Sun L, Jiang W, Zhang P, Xiao Q, Han D, Saiyin H, Zhu J, Chen T, Roberts LR, Huang H, Yu L. Metallothionein MT1M is a tumor suppressor of human hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2012; 33: 2568-2577 [PMID: 22971577 DOI: 10.1093/carcin/bgs287]
  - 7 Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463 [PMID: 15164071 DOI: 10.1038/nature02625]
  - 8 Tao SF, Zhang CS, Guo XL, Xu Y, Zhang SS, Song JR, Li R, Wu MC, Wei LX. Anti-tumor effect of 5-aza-2'-deoxycytidine by inhibiting telomerase activity in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2334-2343 [PMID: 22654424 DOI: 10.3748/wjg.v18.i19.2334]
  - 9 Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826 [PMID: 8790415 DOI: 10.1073/pnas.93.18.9821]
  - 10 Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 2009; 23: 781-783 [PMID: 19339683 DOI: 10.1101/gad.1787609]
  - 11 Moribe T, Iizuka N, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Hamamoto Y, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Methylation of multiple genes as molecular markers for diagnosis of a small, well-differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2009; 125: 388-397 [PMID: 19384946 DOI: 10.1002/ijc.24394]
  - 12 Bai X, Wu L, Liang T, Liu Z, Li J, Li D, Xie H, Yin S, Yu J, Lin Q, Zheng S. Overexpression of myocyte enhancer factor 2 and histone hyperacetylation in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 83-91 [PMID: 17611778 DOI: 10.1007/s00432-007-0252-7]
  - 13 Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatal Res* 2007; 37: 974-983 [PMID: 17584191 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2007.00141.x]
  - 14 Scusi EL, Loose DS, Wray CJ. Clinical implications of DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 2011; 13: 369-376 [PMID: 21609368 DOI: 10.1111/j.1477-2574.2011.00303.x]
  - 15 Okamura Y, Nomoto S, Kanda M, Li Q, Nishikawa Y, Sugimoto H, Kanazumi N, Takeda S, Nakao A. Leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) is detected as a novel suppressor gene of hepatocellular carcinoma using double-combination array. *Cancer Lett* 2010; 289: 170-177 [PMID: 19733004 DOI: 10.1016/j.canlet.2009.08.013]
  - 16 Jain S, Chang TT, Hamilton JP, Lin SY, Lin YJ, Evans AA, Selaru FM, Lin PW, Chen SH, Block TM, Hu CT, Song W, Meltzer SJ, Su YH. Methylation of the CpG sites only on the sense strand of the APC gene is specific for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2011; 6: e26799 [PMID: 22073196 DOI: 10.1371/journal.pone.0026799]
  - 17 Yang XX, Sun JZ, Li FX, Wu YS, Du HY, Zhu W, Li XH, Li M. Aberrant methylation and downregulation of sall3 in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 2719-2726 [PMID: 22690083 DOI: 10.3748/wjg.v18.i21.2719]
  - 18 Dohi O, Yasui K, Gen Y, Takada H, Endo M, Tsuji K, Konishi C, Yamada N, Mitsuyoshi H, Yagi N, Naito Y, Tanaka S, Arii S, Yoshikawa T. Epigenetic silencing of miR-335 and its host gene MEST in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2013; 42: 411-418 [PMID: 23229728 DOI: 10.3892/ijo.2012.1724]
  - 19 Bellefroid EJ, Poncelet DA, Lecocq PJ, Revelant O, Martial JA. The evolutionarily conserved Krüppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 3608-3612 [PMID: 2023909 DOI: 10.1073/pnas.88.9.3608]
  - 20 Rippe V, Belge G, Meiboom M, Kazmierczak B, Fusco A, Bullerdiek J. A KRAB zinc finger protein gene is the potential target of 19q13 translocation in benign thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26: 229-236 [PMID: 10502321 DOI: 10.1002/(SIC)1098-2264(199911)26:3<229::AID-GCC7>3.0.CO;2-J]
  - 21 Meiboom M, Murua Escobar H, Pentimalli F, Fusco A, Belge G, Bullerdiek J. A 3.4-kbp transcript of ZNF331 is solely expressed in follicular thyroid adenomas. *Cytogenet Genome Res* 2003; 101: 113-117 [PMID: 14610350 DOI: 10.1159/000074165]
  - 22 Yu J, Liang QY, Wang J, Cheng Y, Wang S, Poon TC, Go MY, Tao Q, Chang Z, Sung JJ. Zinc-finger protein 331, a novel putative tumor suppressor, suppresses growth and invasiveness of gastric cancer. *Oncogene* 2013; 32: 307-317 [PMID: 22370639 DOI: 10.1038/onc.2012.54]
  - 23 Enge M, Bao W, Hedström E, Jackson SP, Moumen A, Selivanova G. MDM2-dependent down-regulation of p21 and hnRNP K provides a switch between apoptosis and growth arrest induced by pharmacologically activated p53. *Cancer Cell* 2009; 15: 171-183 [PMID: 19249676 DOI: 10.1016/j.ccr.2009.01.019]
  - 24 Saha MN, Jiang H, Mukai A, Chang H. RITA inhibits multiple myeloma cell growth through induction of p53-mediated caspase-dependent apoptosis and synergistically enhances nutlin-induced cytotoxic responses. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 3041-3051 [PMID: 21062913 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0471]

# 同行评价

本文具有一定的新颖性, 也有重要的临床意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静





# 维生素D与非酒精性脂肪性肝病关系的研究进展

朴熙绪, 韩红梅

## ■背景资料

维生素D是一种人体必需的脂溶性甾醇类衍生物, 因其生物学作用广泛被视为一种甾醇类激素。人们熟知的维生素D的作用是其钙磷代谢和抗佝偻病作用。近年的研究表明, 维生素D参与细胞的增殖、分化与凋亡, 具有免疫调节、抗炎、抗纤维化等多种功能, 并且与代谢综合征, 不同病因的慢性肝病有一定关系。维生素D与NAFLD相关的研究领域已取得一些进展。

## ■同行评议者

张明辉, 副主任医师, 河北医科大学第一医院肝病中心(传染病); 刘长征, 副教授, 中国医学科学院基础医学研究所

朴熙绪, 韩红梅, 延边大学附属医院消化内科 吉林省延吉市133000

朴熙绪, 教授, 主要从事慢性肝病的基础与临床研究。

作者贡献分布: 本综述由朴熙绪与韩红梅共同完成; 由朴熙绪审校。

通讯作者: 朴熙绪, 教授, 133000, 吉林省延吉市局子街1327号, 延边大学附属医院消化内科。xixupiao@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-01-28 修回日期: 2013-02-20

接受日期: 2013-03-08 在线出版日期: 2013-03-28

## Relationship between vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease

Xi-Xu Piao, Hong-Mei Han

Xi-Xu Piao, Hong-Mei Han, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China

Correspondence to: Xi-Xu Piao, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Yanbian University, 1327 Juzi Street, Yanji 133000, Jilin Province, China. xixupiao@yahoo.com.cn

Received: 2013-01-28 Revised: 2013-02-20

Accepted: 2013-03-08 Published online: 2013-03-28

## Abstract

Vitamin D is an important secosteroid hormone with pleiotropic effects, including regulation of cell proliferation, differentiation, apoptosis, and immunomodulation. Recently certain evidence has indicated that insufficiency of vitamin D or vitamin D deficiency is related to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Subjects with NAFLD have lower serum vitamin D levels than controls, and low vitamin D levels are closely associated with histologic severity of steatosis, necrosis, inflammation and fibrosis in NAFLD. Vitamin D-deficient diet aggravated high fat diet-induced hepatic inflammation in NAFLD models, while vitamin D supplementation improved hepatic histopathology. Vitamin D may act as a regulator in NAFLD through activating VDR and controlling various genes. Modulating hepatic stellate cells is an important mechanism underlying the antifibrotic effect of vitamin D in NAFLD. Vitamin D is a potential drug for treatment for NAFLD, and further prospective RCT studies are required to acquire sufficient evi-

dence.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Vitamin D; Vitamin D receptor; Nonalcoholic fatty liver disease; Liver fibrosis

Piao XX, Han HM. Relationship between vitamin D and nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 766-772 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/766.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.766>

## 摘要

维生素D是一种具有广泛生物学活性的重要开环甾醇类激素, 对机体细胞增殖、分化、凋亡、免疫调节等均有重要作用。近年的研究表明维生素D不足或缺乏与非酒精性脂肪性肝病(non alcoholic fatty liver disease, NAFLD)相关。NAFLD患者血清25(OH)D水平低于对照人群, 低血清25(OH)D水平与患者的肝组织脂肪变性、炎症、纤维化程度有相关关系。维生素D缺乏饮食可加重NAFLD模型动物肝组织炎症, 补充维生素D可减轻肝组织病理改变。维生素D对NAFLD作用可能通过其受体VDR介导, 经众多基因调控实现。维生素D对肝星状细胞的调节可能是其抗非酒精性脂肪性肝纤维化的重要机制。至今的研究提示维生素D有望成为NAFLD的治疗药物, 但需要更多高质量实验和循证医学的证据。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 维生素D; 维生素D受体; 非酒精性脂肪性肝病; 肝纤维化

朴熙绪, 韩红梅. 维生素D与非酒精性脂肪性肝病关系的研究进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21(9): 766-772 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/766.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.766>

## 0 引言

维生素D是一种人体必需的脂溶性甾醇类衍生物, 因其生物学作用广泛而视为一种甾醇类激

素。人们最熟知的维生素D的作用是其钙磷代谢的调节和抗佝偻病作用。近年的研究表明, 维生素D参与细胞的增殖、分化及凋亡, 具有免疫调节、抗炎、抗氧化、抗纤维化、抗肿瘤等多种生物学功能<sup>[1-11]</sup>。维生素D的这些功能与不同病因的慢性肝病的发生发展有一定关系<sup>[12-16]</sup>。本文对维生素D代谢、机体维生素D不足及其与非酒精性脂肪性肝病(non alcoholic fatty liver disease, NAFLD)关系的研究现状做简要综述。

## 1 维生素D的合成与代谢

机体维生素D的主要来源是皮肤合成, 少部分来自饮食。植物含维生素D<sub>2</sub>, 动物含D<sub>3</sub>。在阳光中波长290-315 nm的紫外线作用下皮肤内胆固醇代谢物7-脱氢胆固醇转化为维生素D<sub>3</sub>的前体物, 后者以热依赖过程迅速转化为维生素D<sub>3</sub>, 但过度的阳光照射并不引起维生素D中毒, 因为过量的维生素D还可被阳光破坏<sup>[17]</sup>。机体内少量的维生素D来自饮食, 如肥鱼、蛋黄、受紫外线照射的蘑菇类、补充食品等。饮食来源的维生素D<sub>2</sub>和D<sub>3</sub>在胆汁酸作用下由肠道吸收并以乳糜微粒形式经淋巴引流入静脉血流。皮肤和饮食来源的维生素D可储藏在体内脂肪细胞或可直接到达肝脏, 在肝脏25羟化酶作用下经羟化反应形成25羟维生素D[25(OH)D]。25羟化酶是细胞色素P450的亚型, 包括微粒体CYP2R1和线粒体CYP27A1酶。25(OH)D是血液中维生素D的主要形式, 尚无生物学活性, 因其半衰期较长(2-3 wk), 常作为检测机体维生素D储备状态的指标。血液中25(OH)D绝大多数(88%)与维生素D连接蛋白(vitamin D-binding protein, DBP)结合。DBP是分子量58 kDa的α-巨球蛋白, 在肝内合成, 是位于第4号染色体的白蛋白基因家族成员之一, 与白蛋白, 甲胎蛋白有高度同源系列<sup>[18]</sup>。DBP有多态性, 常见亚型有Gc1F、Gc1S和Gc2, 其中Gc1F对维生素D的亲合力最强, 这些亚型分布有显著的种族差异<sup>[19]</sup>。DBP除了携带维生素D的作用外还具有抗炎和免疫调节的作用<sup>[20,21]</sup>。

维生素D活化的最后步骤是25(OH)D在肾脏近曲小管内1α羟化酶(CYP27β1)作用下经1α羟化反应形成具有生物学活性的1,25二羟维生素D[1,25(OH)<sub>2</sub>D], 这一反应也可少量地发生于非肾脏组织细胞, 如淋巴细胞和甲状旁腺组织。1,25(OH)<sub>2</sub>D大多(85%)与维生素D连接蛋白结合, 其半衰期仅约4 h。维生素D的1α羟化作用受血清钙磷浓度, 甲状旁腺激素, 降钙素, 成纤维细胞

生长因子2,3和CYP27β1基因多态性的影响。机体1,25(OH)<sub>2</sub>D的状态受负反馈调节, 过量时自身合成减少或可通过上调25羟维生素D-24-羟化酶(CYP24A1)表达促进1,25(OH)<sub>2</sub>D的分解, 其分解代谢产物由胆汁排泄<sup>[22]</sup>。1,25(OH)<sub>2</sub>D是激活维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)的配体。细胞核内VDR通常与类维生素AX受体形成二聚体, 经维生素D激活与靶基因启动区的维生素D反应元件连接而发挥转录因子的作用, 介导各种生理学反应。1,25(OH)<sub>2</sub>D还有一种更迅速的非基因途径的作用, 即配体直接连接到细胞壁小凹的VDR而起作用, 如在胰岛β细胞或心肌细胞中这一途径增加细胞内可利用钙, 经钙依赖信号途径调节各种生理反应<sup>[23,24]</sup>。1,25(OH)<sub>2</sub>D是激活基因途径还是非基因途径VDR取决于其构象的变化。1,25(OH)<sub>2</sub>D构象的改变是随机发生还是主动调节尚不清楚, 但这种构象的改变和配体-VDR复合体形成的模式, 有助于理解维生素D更广泛的生理学作用<sup>[25]</sup>。

维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)在机体许多组织细胞中表达, 包括肝、胰腺和几种免疫细胞-单核细胞、巨噬细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(naturalkiller cell, NK)细胞等, 特别在胃肠道上皮细胞中表达最丰富。作为1,25(OH)<sub>2</sub>D激活的转录因子VDR直接或间接调节200种以上基因的表达, 从而影响细胞增殖, 分化和凋亡, 调节免疫和血管的生成等。利用VDR敲除小鼠的研究正在兴起, 将揭示维生素D更为广泛的生理学功能<sup>[22]</sup>。

## 2 维生素D不足及其相关因素

血清25(OH)D浓度是反映机体维生素D储备的客观指标, 但其正常范围的界定并不完全一致。一般认为正常人血清25(OH)D浓度为75-120 nmol/L(30-50 ng/mL), 25(OH)D<50 nmol/L(<20 ng/mL)定义为维生素D缺乏, 50-75 nmol/L(20-30 ng/mL)为维生素D不足<sup>[26-29]</sup>。按此定义估计, 全球约10亿人有维生素D不足或缺乏<sup>[30]</sup>。

阳光紫外线暴露不足是人体维生素D不足的最主要因素。现代工业所致空气污染阻滞维生素D合成必需的紫外线辐射, 现代人类生活方式如服饰、工作、旅游和室内运动等均可减少皮肤紫外线照射。为防止皮肤老化和癌症, 人们越来越有意识地利用太阳伞或防晒化妆品来减少阳光照射也是造成机体维生素D不足的重要因素。随着社会发人类生命逐渐延长, 且维

### ■ 相关报道

维生素D缺乏在慢性肝病中比较常见, 特别在慢性丙肝患者中维生素D缺乏可预测抗病毒疗效不佳, 补充维生素D可提高慢性丙型肝炎患者持久的病毒学应答。较多横向和纵向流行病学研究报道维生素D不足或缺乏与代谢综合征及其组分有关, 可能是部分代谢综合征及组分发生的环境因素, 在维生素D不足或缺乏人群中补充维生素D有一定防治代谢综合征的作用。非酒精性脂肪肝病(NAFLD)是代谢综合征的组成成分, 但有关维生素D与NAFLD相关的研究较少。

### ■创新盘点

本文比较系统地复习了维生素D的代谢和维生素D不足的原因,阐述了维生素D与NAFLD相关的研究进展,反映了该领域研究的概况,文献内容较新颖。

生素D的皮肤合成和肠道吸收均随年龄增长而减少。现代许多非强化食物所含维生素D明显少于野生的含油海鱼、淡水鱼、鱼肝油和卵黄等<sup>[30,31]</sup>。机体内维生素D的分布也影响血清维生素D含量。越来越多的肥胖可能通过脂肪细胞内滞留过多而减少血清25(OH)D。肥胖者与非肥胖者的脂肪组织以同样的浓度储存维生素D,因此经口摄入或皮肤合成的维生素D在肥胖者大量脂肪组织中稀释,导致血清维生素D含量下降<sup>[32,33]</sup>。各种原因的吸收不良性体重下降时血清维生素D浓度也下降。可见体质量改变是该领域研究容易混淆的问题。现在维生素D不足已经越来越成为世界范围倍受关注的问题<sup>[34,35]</sup>。另一方面遗传因素也影响机体的维生素D状态。维生素D轴相关基因多态性与血清维生素D浓度相关,包括维生素D连接蛋白,维生素D受体和 $\alpha 1$ 羟化酶基因多态性<sup>[36]</sup>。

### 3 维生素D不足与NAFLD的关系

NAFLD是影像学或组织学证实的肝脏的脂肪变性而无继发脂肪肝的原因,如大量饮酒、促脂肪肝药物、遗传性疾病等。NAFLD与代谢危险因素,如肥胖、糖尿病、脂质紊乱相关。组织学上可分为非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)和非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH),后者可发展为肝硬化、肝癌<sup>[37]</sup>。在发达国家NAFLD是最常见的肝病,发病率高达20%-30%<sup>[38]</sup>,约30%NAFLD患者有组织学证实的NASH<sup>[39]</sup>。NAFLD与代谢综合征密切相关,是代谢综合征的组成成分,其发病机制尚不完全清楚,一般认为胰岛素抵抗是肝脏脂肪变性的关键。

目前维生素D缺乏与代谢综合征主成分肥胖,血脂紊乱,高血糖和高血压等相关研究较多,相关证据也比较充分<sup>[40]</sup>,但维生素D与NAFLD相关研究较少。

个别研究结果血清维生素D水平与NAFLD之间并无独立相关性。在1 630例12-19岁美国青少年为对象的研究中,将血清ALT>30 U/L定义为可疑NAFLD,血清25(OH)D含量由低到高4个组的可疑NAFLD构成比分别为12.1%、6.9%、8.0%和13.17%( $P=0.05$ ),多元回归分析结果可疑NAFLD与男性及超质量有关,在排除肥胖因素后维生素D与可疑NAFLD之间并无相关关系<sup>[41]</sup>。

目前多数研究结果支持维生素D缺乏与NAFLD之间有相关关系。首先,NAFLD患者血

清维生素D浓度较低,低浓度血清维生素D水平增加NAFLD的风险。意大利糖尿病和代谢病临床就诊的262例个体中,162例NAFLD患者的血清25(OH)D水平显著低于无NAFLD者( $14.8 \text{ ng/mL} \pm 9.2 \text{ ng/mL}$  vs  $20.5 \text{ ng/mL} \pm 9.7 \text{ ng/mL}$ ,  $P<0.001$ , OR 0.95, 95%CI 0.92-0.98),在调整性别、年龄、甘油三酯、高密度脂蛋白、高血糖等因素后NAFLD与血清25(OH)D水平之间呈独立相关关系( $P<0.005$ ),在调整性别,年龄,胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)后25(OH)D水平与脂肪肝指数之间呈显著负相关( $P<0.007$ )<sup>[42]</sup>。据韩国的一份最新报告,在6 567例研究对象中,2 863例NAFLD患者的血清25(OH)D水平低于3 704例正常人( $38.7 \text{ nmol/L} \pm 9.0 \text{ nmol/L}$  vs  $39.7 \pm 9.7 \text{ nmol/L}$ ,  $P<0.001$ ),血清25(OH)D低中高水平者中NAFLD的比例分别为45.9%、45.0%和40.0%( $P<0.001$ ),提示低水平血清维生素D增加NAFLD的风险<sup>[43]</sup>。

其次,NAFLD患者的血清维生素D水平与肝脏组织学严重程度相关。Targher等<sup>[44]</sup>报告,60例肝活检证实的NAFLD患者的血清25(OH)D浓度显著低于年龄、性别、体质量指数相配对的健康对照( $51.0 \text{ nmol/L} \pm 22.0 \text{ nmol/L}$  vs  $74.5 \text{ nmol/L} \pm 15.0 \text{ nmol/L}$ ,  $P<0.001$ ),下降的血清25(OH)D浓度与肝组织脂肪变性、坏死性炎症、纤维化严重程度密切相关( $P<0.001$ )。另有一组64例活检证实的NAFLD儿童(平均年龄 $12.6 \text{ 岁} \pm 2.7 \text{ 岁}$ )中平均血清25(OH)D<sub>3</sub>浓度 $21.9 \text{ ng/mL} \pm 10.2 \text{ ng/mL}$ ,35例肝纤维化患儿的25(OH)D<sub>3</sub>水平显著低于29例无纤维化患儿( $17.1 \text{ ng/mL} \pm 7.4 \text{ ng/mL}$  vs  $27.7 \text{ ng/mL} \pm 10.3 \text{ ng/mL}$ ,  $P<0.0001$ ),低水平25(OH)D<sub>3</sub>与肝组织纤维化( $P<0.0001$ )及炎症坏死程度( $P=0.024$ )相关;低25(OH)D<sub>3</sub>水平预测肝纤维化的敏感性为79%,特异性达63%<sup>[45]</sup>。

少数实验研究也支持维生素D与NAFLD相关。Nakano等<sup>[46]</sup>在胆碱缺乏饮食诱导的大鼠非酒精性脂肪性肝炎模型中,用人工阳光照射结果,随着活性维生素D<sub>3</sub>水平的升高,肝组织炎症和纤维化得到显著改善。高脂饮食加维生素D缺乏饮食饲养的SD幼鼠与单纯高脂饮食饲养者比较显示更明显的肝小叶炎症,NAFLD活动性积分(NAS)显著升高( $3.20 \pm 0.47$  vs  $1.50 \pm 0.48$ ,  $P<0.05$ )<sup>[47]</sup>。蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱导的小鼠NAFLD模型中腹腔注射 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可降低血清丙氨酸氨基转移酶和谷草转氨酶,改善肝组织脂肪变性和血管周围炎症细胞浸润程度<sup>[48]</sup>。



#### 4 维生素D对NAFLD的作用机制研究

维生素D对NAFLD的作用机制尚不完全清楚. 可能与其促进胰岛素分泌, 改善胰岛素抵抗, 抑制肝组织脂肪生成, 促进脂肪酸氧化作用有关, 其作用经VDR介导, 可能与其多种基因的调控作用有关. 维生素D通过对肝星状细胞的调节发挥其抗非酒精性脂肪性肝纤维化的作用.

NAFLD与糖尿病及胰岛素抵抗密切相关, 因此维生素D的抗NAFLD作用可能与其促进胰岛素分泌, 改善胰岛素抵抗作用有关. 早在上世纪80年代初就已发现维生素D在胰腺的靶细胞可能是胰岛 $\beta$ 细胞, 维生素D缺乏可抑制胰岛素分泌<sup>[49,50]</sup>. 新近的体外实验表明, 维生素D<sub>3</sub>通过与其受体结合, 降低细胞因子诱导的胰腺 $\beta$ 细胞凋亡, 改善胰岛素分泌<sup>[51]</sup>, 可通过调节胰岛 $\beta$ 细胞内钙浓度, 抵抗 $\beta$ 细胞凋亡, 促进 $\beta$ 细胞增殖等途径影响胰岛素分泌<sup>[52]</sup>.

已有不少研究提示, 维生素D不足与胰岛素抵抗相关, 补充维生素D可改善胰岛素抵抗. 494例日本成年人中血清25(OH)D水平与胰岛素抵抗指标HOMA-IR呈显著负相关( $P = 0.01$ ), 与25(OH)D含量正常组相比HOMA-IR指数在25(OH)D不足组高5%, 25(OH)D缺乏组高18%, 提示维生素D状态与胰岛素抵抗相关<sup>[53]</sup>.

肝组织脂肪生成过多和分解减少是肝内脂肪过多沉积的直接原因. 给SD大鼠分别给予正常饮食, 高脂饮食或高脂饮食加1.0、2.5和5.0  $\mu\text{g/kg}$  1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>隔日1次腹腔内注射8 wk, 结果表明1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>可预防HFD诱导的大鼠体质量和肝脏重量增加, 剂量依赖地减轻肝脏脂肪变性, 下调肝组织中参与脂肪生成的胆固醇调节元件蛋白-1c(SREBP-1c)及其靶基因乙酰辅酶A羧化酶和脂肪酸合成酶mRNA表达, 上调肝组织中参与脂肪酸氧化过程的过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )及其靶基因肉毒碱棕榈酰转移酶mRNA表达, 提示1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>预防大鼠肝脏脂肪变性的作用与其抑制肝组织脂肪生成, 促进脂肪酸氧化作用有关<sup>[54]</sup>.

维生素D对NAFLD作用与体内多种受体, 细胞因子及酶的调控相关. Roth等对鼠龄25 d的SD幼鼠分别用低脂饮食, 低脂加维生素D缺乏饮食(LFD+VDD), 高脂饮食(WD)或高脂加维生素D缺乏饮食(WD+VDD)饲养10 wk后观察结果, 含VDD组的25(OH)D比对照组下降29%(95%CI: 23%-36%), 表现出显著的肝脂肪变性, 小叶炎症

及较高的NAFLD活动性积分; WD+VDD组的肝组织Toll样受体(Toll-like receptors, TLR)2, TLR4, TLR9, 抵抗素(resistin), 白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-6及氧化应激标志物血红素氧化酶1(heme oxygenase, HO-1)的mRNA表达均显著高于WD组( $P < 0.05$ ); 逻辑回归分析显示, NAS积分与TLR2、4、9与内毒素受体CD14, PPAR $\gamma$ 和HO-1的mRNA表达水平之间呈显著相关关系. 研究者认为, 维生素D缺乏可提高肝组织抵抗素基因表达, 上调炎症和氧化应激基因, 可能通过内毒素, 经TLR引起NAFLD<sup>[47]</sup>. 25例非酒精性脂肪性肝炎患者的肝组织中用免疫组织化学法检测VDR、CYP2R1和CYP27A1结果, 肝内胆管细胞VDR表达与脂肪变性严重程度( $P < 0.02$ ), 小叶内炎症( $P < 0.01$ )及非酒精性脂肪性肝病积分( $P < 0.03$ )呈负相关, 肝内炎症细胞VDR阳性与肝细胞CYP2R1的表达之间呈密切相关, 提示维生素D/VDR系统可能参与NAFLD的发病过程<sup>[55]</sup>.

在蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱导的小鼠NAFLD模型中, 肝组织 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)和I型胶原mRNA的表达显著升高, 而5  $\mu\text{g/kg}$  1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 2次/wk腹腔注射8 wk使这些指标均显著下降( $P = 0.020$ ,  $P = 0.027$ ), 维生素D可能通过 $\alpha$ -SMA和I型胶原基因调控延缓小鼠非酒精性脂肪性肝纤维化的进程<sup>[48]</sup>.

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是各种原因的肝纤维化发生发展的关键细胞. 在各种损伤因子作用下HSC由无活性储脂细胞激活为有活性的成纤维细胞, 激活的HSC最显著标志是 $\alpha$ -SMA的表达, 可合成大量的细胞外基质特别是I型胶原在肝组织沉积而引起肝纤维化<sup>[56]</sup>. HSC还可表达基质金属蛋白酶(metalloproteinase, MMP)和组织金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP), MMP具有降解细胞外基质的作用, TIMP则抑制MMP的活性, 因此对肝纤维化的发生发展都有重要作用<sup>[57]</sup>. 血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是HSC最有效的促分裂因子, 转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )是HSC细胞外基质蛋白合成的主要刺激因子<sup>[58,59]</sup>.

维生素D抗非酒精性脂肪性肝纤维化的作用可能通过对HSC的调控. 首先VDR在HSC中有明显表达, 提示维生素D可能通过HSC的VDR途径发挥其抗纤维化作用. Fickert等<sup>[60]</sup>在人肝星状细胞和肝细胞中检测了多种核受体, 包括核胆汁酸受体(farnesoid X receptor, FXR), 组织

#### ■应用要点

本文有助于维生素D不足或缺乏在NAFLD发病中的作用及其机制的理解, 提示维生素D有望成为防治NAFLD的有效药物.

## ■同行评价

本文比较系统地介绍了维生素D的代谢,人群中维生素D不足的常见原因,比较全面地收集了维生素D与NAFLD相关的临床和基础研究的文献,内容较新颖,具有一定可读性。

雄烷受体(constitutive androstane receptor, CAR),孕烷受体(pregnen X receptor, PXR)及VDR等,结果发现人HSC中表达最多的是VDR, VDR在HSC的表达显著多于肝细胞( $16.1 \pm 8.3$  vs  $0.7 \pm 0.6$ ,  $P < 0.05$ )。

研究表明VDR在静止的HSC高度表达,当HSC激活期间VDR的表达下降40%。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可提高激活的HSC对VDR表达。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 还可显著抑制PDGF诱导的HSC增殖和Cyclin D1表达50%,抑制HSC组织金属蛋白酶抑制剂1(tissue inhibitor of metalloprotease 1, TIMP-1)的表达60%,降下调节1型胶原a1 40%,并使基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)的活性增加30%。该研究还利用shRNA消除VDR的方法证实 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对CyclinD1和1型胶原a1表达的抑制作用呈VDR依赖性<sup>[61]</sup>。Seydel等<sup>[62]</sup>的研究发现,游离脂肪酸可刺激体外培养的人肝星状细胞株LX-2细胞a-SMA和TGF- $\beta$  mRNA的表达增强,而维生素D可显著抑制游离脂肪酸对LX-2细胞a-SMA和TGF- $\beta$  mRNA表达的刺激作用。这些研究表明HSC有VDR,维生素D可经过VDR介导抑制HSC增殖和激活,但维生素D对HSC凋亡的影响尚未见文献报道。

## 5 结论

机体维生素D主要来自皮肤,少数从饮食摄取。体内维生素D在肝内经25羟化反应形成 $25(\text{OH})\text{D}$ ,在肾脏经1 $\alpha$ 羟化反应形成 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 。 $25(\text{OH})\text{D}$ 半衰期较长,是反应机体维生素D储备的指标, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 是维生素D的活性形式,经VDR介导发挥作用。现代生活方式及遗传因素与人类维生素D不足相关。NAFLD患者维生素D不足常见,与其肝组织脂肪变性、炎症、纤维化相关、补充维生素D可改善NAFLD模型动物的肝组织病理变化。维生素D对NAFLD作用的机制尚不清楚,可能通过VDR介导的基因调控,抑制肝内脂肪生成,促进脂肪酸氧化,发挥抗炎抗纤维化等作用,其抗非酒精性脂肪性肝纤维化作用可能通过对HSC的调控。维生素D可能是防治NAFLD的一种有效药物,但需要更多高水平实验研究和循证医学的证据来证明。

## 6 参考文献

- 1 Hadjittofi C, Coran AG, Mogilner JG, Pollak Y, Matter I, Sukhotnik I. Dietary supplementation with vitamin D stimulates intestinal epithelial cell turn-

over after massive small bowel resection in rats. *Pediatr Surg Int* 2013; 29: 41-50 [PMID: 23114406 DOI: 10.1007/s00383-012-3205-4]

- 2 Aoi N, Inoue K, Chikanishi T, Fujiki R, Yamamoto H, Kato H, Eto H, Doi K, Itami S, Kato S, Yoshimura K.  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 modulates the hair-inductive capacity of dermal papilla cells: therapeutic potential for hair regeneration. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1: 615-626 [PMID: 23197867 DOI: 10.5966/sctm.2012-0032]
- 3 Székely JI, Pataki Á. Effects of vitamin D on immune disorders with special regard to asthma, COPD and autoimmune diseases: a short review. *Expert Rev Respir Med* 2012; 6: 683-704 [PMID: 23234453 DOI: 10.1586/ers.12.57]
- 4 Stratos I, Li Z, Herlyn P, Rotter R, Behrendt AK, Mittlmeier T, Vollmar B. Vitamin d increases cellular turnover and functionally restores the skeletal muscle after crush injury in rats. *Am J Pathol* 2013; 182: 895-904 [PMID: 23260772 DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.11.006]
- 5 Ferder M, Inserra F, Manucha W, Ferder L. The world pandemic of Vitamin D deficit could possibly be explained by cellular inflammatory response activity induced by the renin angiotensin system. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013 Jan 30. [Epub ahead of print] [PMID: 23364265 DOI: 10.1152/ajpcell.00403.2011]
- 6 Golden GA, Wyatt TA, Romberger DJ, Reiff D, McCaskill M, Bauer C, Gleason AM, Poole JA. Vitamin D treatment modulates organic dust-induced cellular and airway inflammatory consequences. *J Biochem Mol Toxicol* 2013; 27: 77-86 [PMID: 23281135 DOI: 10.1002/jbt.21467]
- 7 Kono K, Fujii H, Nakai K, Goto S, Kitazawa R, Kitazawa S, Shinohara M, Hirata M, Fukagawa M, Nishi S. Anti-oxidative effect of vitamin d analog on incipient vascular lesion in non-obese type 2 diabetic rats. *Am J Nephrol* 2013; 37: 167-174 [PMID: 23406697 DOI: 10.1159/000346808]
- 8 Tan X, Li Y, Liu Y. Therapeutic role and potential mechanisms of active Vitamin D in renal interstitial fibrosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 491-496 [PMID: 17207995 DOI: 10.1016/j.jsbmb.2006.11.011]
- 9 Shen CL, Samathanam C, Graham S, Dagda RY, Chyu MC, Dunn DM. Green tea polyphenols and  $1\alpha$ -OH-vitamin D attenuate chronic inflammation-induced myocardial fibrosis in female rats. *J Med Food* 2012; 15: 269-277 [PMID: 22181074 DOI: 10.1089/jmf.2011.0163]
- 10 Milczarek M, Rosinska S, Psurski M, Maciejewska M, Kutner A, Wietrzyk J. Combined colon cancer treatment with vitamin d analogs and irinotecan or oxaliplatin. *Anticancer Res* 2013; 33: 433-444 [PMID: 23393334]
- 11 Reddy KK. Vitamin d level and Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and melanoma risk. *J Invest Dermatol* 2013; 133: 589-592 [PMID: 23399821 DOI: 10.1038/jid.2012.427]
- 12 Stokes CS, Volmer DA, Grünhage F, Lammert F. Vitamin D in chronic liver disease. *Liver Int* 2013; 33: 338-352 [PMID: 23402606 DOI: 10.1111/liv.12106]
- 13 Lim LY, Chalasani N. Vitamin d deficiency in patients with chronic liver disease and cirrhosis. *Curr Gastroenterol Rep* 2012; 14: 67-73 [PMID: 22113744 DOI: 10.1007/s11894-011-0231-7]
- 14 Malham M, Peter Jørgensen S, Lauridsen AL, Ott P, Glerup H, Dahlerup JF. The effect of a single

- oral megadose of vitamin D provided as either ergocalciferol (D) or cholecalciferol (D) in alcoholic liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 172-178 [PMID: 22027703 DOI: 10.1097/MEG.0b013e32834d1755]
- 15 Ladero JM, Torrejón MJ, Sánchez-Pobre P, Suárez A, Cuenca F, de la Orden V, Devesa MJ, Rodrigo M, Estrada V, López-Alonso G, Agúndez JA. Vitamin D deficiency and vitamin D therapy in chronic hepatitis C. *Ann Hepatol* 2013; 12: 199-204 [PMID: 23396730]
  - 16 Petta S, Ferraro D, Cammà C, Cabibi D, Di Cristina A, Di Marco V, Di Stefano R, Grimaudo S, Mazzola A, Levrero M, Scazzone C, Craxi A. Vitamin D levels and IL28B polymorphisms are related to rapid virological response to standard of care in genotype 1 chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2012; 17: 823-831 [PMID: 22505587 DOI: 10.3851/IMP2100]
  - 17 Boucher BJ. Vitamin D insufficiency and diabetes risks. *Curr Drug Targets* 2011; 12: 61-87 [PMID: 20795936 DOI: 10.2174/138945011793591653]
  - 18 White P, Cooke N. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11: 320-327 [PMID: 10996527 DOI: 10.1016/S1043-2760(00)00317-9]
  - 19 Kamboh MI, Ferrell RE. Ethnic variation in vitamin D-binding protein (GC): a review of isoelectric focusing studies in human populations. *Hum Genet* 1986; 72: 281-293 [PMID: 3516862 DOI: 10.1007/BF00290950]
  - 20 Yamamoto N, Homma S. Vitamin D3 binding protein (group-specific component) is a precursor for the macrophage-activating signal factor from lysophosphatidylcholine-treated lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8539-8543 [PMID: 1924312 DOI: 10.1073/pnas.88.19.8539]
  - 21 Metcalf JP, Thompson AB, Gossman GL, Nelson KJ, Koyama S, Rennard SI, Robbins RA. Gc-globulin functions as a chemotaxin in the lower respiratory tract. A potential mechanism for lung neutrophil recruitment in cigarette smokers. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 844-849 [PMID: 2008995]
  - 22 Kitson MT, Roberts SK. D-livering the message: the importance of vitamin D status in chronic liver disease. *J Hepatol* 2012; 57: 897-909 [PMID: 22634121 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.04.033]
  - 23 Scholar EM, Paul S. Stimulation of tumor cell growth by vasoactive intestinal peptide. *Cancer* 1991; 67: 1561-1564 [PMID: 2001545 DOI: 10.1002/1097-0142(19910315)67:6<1561::AID-CNCR2820670617>3.0.CO;2-Z]
  - 24 Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006; 147: 5542-5548 [PMID: 16946007 DOI: 10.1210/en.2006-0946]
  - 25 Mizwicki MT, Norman AW. The vitamin D sterol-vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. *Sci Signal* 2009; 2: re4 [PMID: 19531804 DOI: 10.1126/scisignal.275re4]
  - 26 Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 353-373 [PMID: 16529140 DOI: 10.4065/81.3.353]
  - 27 Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 18-28 [PMID: 16825677]
  - 28 Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet* 1998; 351: 805-806 [PMID: 9519960 DOI: 10.1016/S0140-6736(05)78933-9]
  - 29 Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005; 16: 713-716 [PMID: 15776217 DOI: 10.1007/s00198-005-1867-7]
  - 30 Bouillon R. Genetic and environmental determinants of vitamin D status. *Lancet* 2010; 376: 148-149 [PMID: 20541253 DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60635-6]
  - 31 Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol* 2011; 91: 115-124 [PMID: 21384086 DOI: 10.2340/00015555-0980]
  - 32 Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 690-693 [PMID: 10966885]
  - 33 Drincic AT, Armas LA, Van Diest EE, Heaney RP. Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20: 1444-1448 [PMID: 22262154 DOI: 10.1038/oby.2011.404]
  - 34 Prentice A. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Nutr Rev* 2008; 66: S153-S164 [PMID: 18844843 DOI: 10.1111/j.1753-4887.2008.00100.x]
  - 35 Soares MJ, Ping-Delfos WC, Sherrieff JL, Nezhad DH, Cummings NK, Zhao Y. Vitamin D and parathyroid hormone in insulin resistance of abdominal obesity: cause or effect? *Eur J Clin Nutr* 2011; 65: 1348-1352 [PMID: 21712836 DOI: 10.1038/ejcn.2011.111]
  - 36 Berry D, Hyppönen E. Determinants of vitamin D status: focus on genetic variations. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011; 20: 331-336 [PMID: 21654390 DOI: 10.1097/MNH.0b013e328346d6ba]
  - 37 Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2012; 55: 2005-2023 [PMID: 22488764 DOI: 10.1002/hep.25762]
  - 38 Lazo M, Hernaez R, Bonekamp S, Kamel IR, Brancati FL, Guallar E, Clark JM. Non-alcoholic fatty liver disease and mortality among US adults: prospective cohort study. *BMJ* 2011; 343: d6891 [PMID: 22102439 DOI: 10.1136/bmj.d6891]
  - 39 Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, Harrison SA. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011; 140: 124-131 [PMID: 20858492 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.09.038]
  - 40 Boucher BJ. Is vitamin D status relevant to metabolic syndrome? *Dermatoendocrinol* 2012; 4: 212-224 [PMID: 22928079 DOI: 10.4161/derm.20012]
  - 41 Katz K, Brar PC, Parekh N, Liu YH, Weitzman M. Suspected nonalcoholic Fatty liver disease is not associated with vitamin d status in adolescents after adjustment for obesity. *J Obes* 2010; 2010: 496829 [PMID: 21331294 DOI: 10.1155/2010/496829]
  - 42 Barchetta I, Angelico F, Del Ben M, Baroni MG, Pozzilli P, Morini S, Cavallo MG. Strong asso-



- ciation between non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and low 25(OH) vitamin D levels in an adult population with normal serum liver enzymes. *BMC Med* 2011; 9: 85 [PMID: 21749681 DOI: 10.1186/1741-7015-9-85]
- 43 Rhee EJ, Kim MK, Park SE, Park CY, Baek KH, Lee WY, Kang MI, Park SW, Kim SW, Oh KW. High serum vitamin D levels reduce the risk for nonalcoholic fatty liver disease in healthy men independent of metabolic syndrome. *Endocr J* 2013 Feb 13. [Epub ahead of print] [PMID: 23411507 DOI: 10.1507/endocr.J12-0387]
  - 44 Targher G, Bertolini L, Scala L, Cigolini M, Zenari L, Falezza G, Arcaro G. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D3 concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17: 517-524 [PMID: 16928437]
  - 45 Manco M, Ciampalini P, Nobili V. Low levels of 25-hydroxyvitamin D(3) in children with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51: 2229; author reply 2230 [PMID: 20513013 DOI: 10.1002/hep.23724]
  - 46 Nakano T, Cheng YF, Lai CY, Hsu LW, Chang YC, Deng JY, Huang YZ, Honda H, Chen KD, Wang CC, Chiu KW, Jawan B, Eng HL, Goto S, Chen CL. Impact of artificial sunlight therapy on the progress of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *J Hepatol* 2011; 55: 415-425 [PMID: 21184788 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.11.028]
  - 47 Roth CL, Elfers CT, Figlewicz DP, Melhorn SJ, Morton GJ, Hoofnagle A, Yeh MM, Nelson JE, Kowdley KV. Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation. *Hepatology* 2012; 55: 1103-1111 [PMID: 21994008 DOI: 10.1002/hep.24737]
  - 48 李艳芳, 唐夕岚, 凌文华. 1, 25-二羟基维生素D3对小鼠非酒精性脂肪性肝纤维化进程的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 3191-3196
  - 49 Clark SA, Stumpf WE, Sar M, DeLuca HF, Tanaka Y. Target cells for 1,25 dihydroxyvitamin D3 in the pancreas. *Cell Tissue Res* 1980; 209: 515-520 [PMID: 6996826 DOI: 10.1007/BF00234764]
  - 50 Norman AW, Frankel JB, Heldt AM, Grodsky GM. Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* 1980; 209: 823-825 [PMID: 6250216 DOI: 10.1126/science.6250216]
  - 51 Wang AP, Li X, Chao C, Huang G, Liu BL, Peng J, Zhou ZG. [1 $\alpha$ , 25(OH)(2) D(3) protects pancreatic  $\beta$ -cell line from cytokine-induced apoptosis and impaired insulin secretion]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2012; 92: 695-699 [PMID: 22781299]
  - 52 Takiishi T, Gysemans C, Bouillon R, Mathieu C. Vitamin D and diabetes. *Rheum Dis Clin North Am* 2012; 38: 179-206 [PMID: 22525851 DOI: 10.1016/j.rdc.2012.03.015]
  - 53 Pham NM, Akter S, Kurotani K, Nanri A, Sato M, Hayabuchi H, Yasuda K, Mizoue T. Serum 25-hydroxyvitamin D and markers of insulin resistance in a Japanese working population. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66: 1323-1328 [PMID: 23093338 DOI: 10.1038/ejcn.2012.169]
  - 54 Yin Y, Yu Z, Xia M, Luo X, Lu X, Ling W. Vitamin D attenuates high fat diet-induced hepatic steatosis in rats by modulating lipid metabolism. *Eur J Clin Invest* 2012; 42: 1189-1196 [PMID: 22958216 DOI: 10.1111/j.1365-2362.2012.02706.x]
  - 55 Barchetta I, Carotti S, Labbadia G, Gentilucci UV, Muda AO, Angelico F, Silecchia G, Leonetti F, Fraioli A, Picardi A, Morini S, Cavallo MG. Liver vitamin D receptor, CYP2R1, and CYP27A1 expression: relationship with liver histology and vitamin D3 levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis or hepatitis C virus. *Hepatology* 2012; 56: 2180-2187 [PMID: 22753133 DOI: 10.1002/hep.25930]
  - 56 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835 [PMID: 8502273]
  - 57 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000; 113: 443-453 [PMID: 10933221]
  - 58 Foo NP, Lin SH, Lee YH, Wu MJ, Wang YJ.  $\alpha$ -Lipoic acid inhibits liver fibrosis through the attenuation of ROS-triggered signaling in hepatic stellate cells activated by PDGF and TGF- $\beta$ . *Toxicology* 2011; 282: 39-46 [PMID: 21251946 DOI: 10.1016/j.tox.2011.01.009]
  - 59 Atorrasagasti C, Aquino JB, Hofman L, Alaniz L, Malvicini M, Garcia M, Benedetti L, Friedman SL, Podhajcer O, Mazzolini G. SPARC downregulation attenuates the profibrogenic response of hepatic stellate cells induced by TGF- $\beta$ 1 and PDGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G739-G748 [PMID: 21311029 DOI: 10.1152/ajpgi.00316.2010]
  - 60 Fickert P, Fuchsbichler A, Moustafa T, Wagner M, Zollner G, Halilbasic E, Stöger U, Arrese M, Pizarro M, Solís N, Carrasco G, Caligiuri A, Sombetzki M, Reisinger E, Tsybrovskyy O, Zatloukal K, Denk H, Jaeschke H, Pinzani M, Trauner M. Farnesoid X receptor critically determines the fibrotic response in mice but is expressed to a low extent in human hepatic stellate cells and periductal myofibroblasts. *Am J Pathol* 2009; 175: 2392-2405 [PMID: 19910507 DOI: 10.2353/ajpath.2009.090114]
  - 61 Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Ben Tov A, Brazowski E, Reif S. Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. *Gut* 2011; 60: 1728-1737 [PMID: 21816960 DOI: 10.1136/gut.2010.234666]
  - 62 Seydel S, Beilfuss A, Kahraman A, Aksoy K, Gerken G, Akkiz H, Canbay A. Vitamin D ameliorates stress ligand expression elicited by free fatty acids in the hepatic stellate cell line LX-2. *Turk J Gastroenterol* 2011; 22: 400-407 [PMID: 21948571]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



# PDGF及其受体与肝纤维化的相关性

黄雯, 朱萱

黄雯, 朱萱, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

黄雯, 主要从事肝病学方面的研究。

作者贡献分布: 本文综述由黄雯完成; 朱萱审校。

通讯作者: 朱萱, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科. jyyfy@163.com

电话: 0791-8692505

收稿日期: 2013-01-26 修回日期: 2013-02-17

接受日期: 2013-02-20 在线出版日期: 2013-03-28

## Correlation between PDGFs and their receptor and liver fibrosis

Wen Huang, Xuan Zhu

Wen Huang, Xuan Zhu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Xuan Zhu, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwaizheng Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. jyyfy@163.com

Received: 2013-01-26 Revised: 2013-02-17

Accepted: 2013-02-20 Published online: 2013-03-28

## Abstract

Liver fibrosis occurs as a result of various injurious processes and is the common pathologic basis for all chronic hepatic diseases. Platelet-derived growth factors (PDGFs) are homodimers or heterodimers consisting of two polypeptide chains. Previous studies have proved that PDGFs are closely related to the occurrence and development of liver fibrosis. In this article, we review the advances in research on the role of PDGFs and their receptor in pathogenesis and therapy of liver fibrosis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Platelet-derived growth factors; Platelet-derived growth-FR; hepatic stellate cells; Liver fibrosis

Huang W, Zhu X. Correlation between PDGFs and their receptor and liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 773-778 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/773.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.773>

## 摘要

肝纤维化是多种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段, 是所有慢性肝病的共同病理基础。血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factors, PDGFs)是由4个亚基同型或异型两两相互聚合形成的二聚体, 现已证实其与肝纤维化的形成、发展密切相关。本文就PDGFs及其受体在肝纤维化的发生、治疗及其研究进展作一综述。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 血小板源性生长因子; 血小板源性生长因子受体; 肝星状细胞; 肝纤维化

黄雯, 朱萱. PDGF及其受体与肝纤维化的相关性. *世界华人消化杂志* 2013; 21(9): 773-778 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/773.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.773>

## 0 引言

肝纤维化, 作为慢性肝病的共同晚期阶段, 主要由慢性肝损诱导的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的活化、增殖引起, 以形成细胞外基质蛋白的沉积物、高发病率和死亡率为主要特点<sup>[1]</sup>。而在多种促纤维化因子中, 血小板衍生生长因子和转化生长因子在调节肝星状细胞的活化、增殖、迁移和细胞外基质的产生方面发挥至关重要的作用<sup>[1,2]</sup>。在肝纤维化时, 各种不同的细胞包括肝星状细胞, 在肝损阶段即可自分泌生长因子以及许多促炎症细胞因子, 并受这些因子的影响而调节自身的促有丝分裂作用, 而血小板源性生长因子信号通路是促进HSC的活化、分裂、增殖的最有效通路之一<sup>[3]</sup>。

## 1 PDGF及其受体的结构

血小板衍生生长因子家族包括4个生长因子成员(PDGF-A、PDGF-B、PDGF-C和PDGF-D), 在炎症微环境的刺激下, 由血小板和Kupffer细胞等分泌<sup>[4]</sup>, 并参与调控纤维母细胞和平滑肌细胞等结缔组织细胞的生长。PDGFs是两条多

## ■背景资料

肝纤维化是所有慢性肝病的共同病理基础, 是多种慢性肝病向肝硬化发展的必经阶段, 如何阻止或逆转肝纤维化的发生、发展成为肝病治疗的重大课题。近年研究发现, 阻断血小板衍生生长因子(PDGFs)家族参与的信号通路可能达到治疗纤维化的目的。因此本文就PDGFs及其受体与肝纤维化的密切关系做一综述。

## ■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

## ■创新盘点

本文全面专一的介绍PDGFs及其受体在结构、亚基、激活的信号通路、机制等方面与肝纤维化的密切关系,强调PDGF-B、PDGF-D、PDGFR- $\beta$ 在肝纤维化过程中的突出作用,概括PDGF家族与其他组织器官纤维化的关系,总结了PDGF家族参与的抗肝纤维化的多方研究成果。

肽链通过二硫键连接而成的同型或异型二聚体,具有多种形式的二聚体结构,即PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB、PDGF-CC以及PDGF-DD<sup>[5]</sup>。PDGFs必须与细胞膜上的相应受体结合后才能发挥其生物学效应。PDGFs有PDGFR $\alpha$ 和PDGFR $\beta$ 两种受体,他们都属于酪氨酸激酶受体(receptor tyrosine kinases, RTKs),并有不同的表达模式和生理作用。PDGFR $\alpha$ 信号调控原肠胚形式及一些诸如肺、肠、皮肤、睾丸、肾、骨和神经组织等的发育;PDGFR $\beta$ 信号被认为是早期造血系统和血管形成的必要调节者<sup>[6]</sup>。PDGFR $\alpha$ 与PDGF-A、-B和-C链具有较高的结合亲和力,而PDGFR $\beta$ 对PDGF-B和PDGF-D的亲和力更高<sup>[7]</sup>,可见PDGFR $\alpha$ 和 $\beta$ 两种受体对PDGF-B链具有较高的敏感性,相比于PDGF其他亚基,PDGF-AB、PDGF-BB的刺激信号在同时具有PDGFR $\alpha$ 和 $\beta$ 两种受体的组织中的传播效率可能更高,PDGF-BB和PDGF-DD较其他亚基在PDGFR $\beta$ 信号传播效率也可能更高。

## 2 PDGF激活的信号通路

PDGF不仅是强有力的促有丝分裂原,而且与TGF- $\beta$ 具有协同促纤维化作用的生长因子<sup>[4]</sup>。PDGF传导的信号由刺激跨膜酪氨酸激酶受体开始,已经证实有该受体启动多条信号通路,主要包括Ras-MAPK、PI3K/Akt、PLC- $\gamma$ 、钙通道、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>、JAK/STAT途径等<sup>[8,9]</sup>,他们都参与细胞的生长发育过程。PDGFRs主要通过生长因子受体结合蛋白2(Grb2)和包含SH2结构域蛋白(Shc)与Ras-MAPK通路链接。Grb2与活化的PDGFR的蛋白结合域SH2结合,参与PDGF介导的信号转导<sup>[10]</sup>,或是Grb2同时与Shc、Sos结合形成Shc-Grb2-Sos复合物,并将Sos激活,激活的Sos与质膜上的Ras蛋白结合,激活Ras,引起下游Raf-1和MAPK级联的活化,进而刺激基因的转录,促进细胞生长、分化及迁移活动<sup>[11]</sup>。PI3K是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,其信号感受器为丝氨酸/苏氨酸激酶,包括Akt/PKB<sup>[12]</sup>、p70S6激酶<sup>[13]</sup>、JNK<sup>[14]</sup>以及Rho家族的小GTP酶类<sup>[15]</sup>等。PDGFRs激活的PI3K/Akt通路促进肌动蛋白重组、增加细胞的迁移、刺激细胞的生长并抑制其凋亡<sup>[12,16]</sup>。PLC- $\gamma$ 与PDGFR结合,发生磷酸化后被激活,导致细胞内钙离子的流动和蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)的活化,刺激细胞的生长和迁移。PDGF诱导复制的能力主要依赖于胞外内流方式引起的细胞内持续的钙离子升高,

而非细胞内储存钙离子的释放,而且PDGF刺激可提高大鼠或人HSCs的Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交换泵活力,而Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>的交换又可调节PDGF诱导的HSCs增生反应<sup>[17]</sup>。Ping等<sup>[18]</sup>发现,降低钙调蛋白依赖性蛋白激酶II水平,不仅可削弱PDGF诱导的HSC增生,还减弱ERK1/2的磷酸化作用,但对于c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)的磷酸化并无影响。PDGFRs还可激活与一些信号分子,包括酶类、适配器和转录因子。PDGF激活的多条信号通路中,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族成员调控的信号通路占主导作用,包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)通路以及两条应激活化蛋白激酶通路(stress activated protein kinase, SAPK): JNK和p38信号通路<sup>[19,20]</sup>。MAPKs能够磷酸化激活多种转录因子,这对于启动细胞的增殖和迁移非常重要。

## 3 PDGF亚基与肝纤维化

关于PDGF与肝纤维化的关系已经有许多相关研究,尽管已经证明PDGF的4种亚基都可能参与肝纤维化过程<sup>[21,22]</sup>,但他们在肝纤维化的发生、发展过程中所发挥的作用并不相同。Breitkopf等<sup>[23]</sup>研究了体外促肝纤维化模型,首先发现静息的HSC向肌成纤维细胞转化过程中PDGF的4个亚型的表达情况:PDGF-A mRNA仅出现微量的波动,PDGF-B在HSC激活的第3天表达已经明显下降,而C型、D型mRNA水平在此过程中表达分别升高5倍和8倍,且持续较长时间,表明在HSC激活的早期主要通过PDGF-B介导信号转导,后期则通过C型、D型介导,且比起PDGFR $\alpha$ 的轻微变化,PDGFR $\beta$ 出现早期持续的高表达。Campbell等<sup>[24]</sup>研究发现PDGF-C可能作为肝纤维化发生的起始作用因子,其作用机制可能是通过诱导大量促肝纤维化途径的激活而发挥作用。最近的研究表明,PDGF-B和PDGF-D经PDGFR $\beta$ 传递的信号与肝纤维化的关系最紧密。Borkham-Kamphorst等<sup>[21]</sup>研究发现,胆总管结扎引起纤维化的大鼠肝脏中PDGF配体和受体的转录水平被上调,其中PDGF-B、PDGF-D和PDGFR $\beta$ 的转录水平比PDGF-A、PDGF-C和PDGFR $\alpha$ 更高,他们还发现,经PDGF-B或PDGF-D刺激的肝星状细胞或肌成纤维母细胞发生显著的增殖表现,而经PDGF-A或PDGF-C处理的却没有明显的改变,说明只有PDGF-D与



PDGF-B对肝脏具有明显的促有丝分裂和纤维化的作用, 而PDGF-A和PDGF-C对肝纤维化的影响甚微<sup>[25]</sup>. Li等<sup>[26]</sup>用PDGF-BB加入HSCs的培养基中培养15 min后, 对比未加药处理的HSCs小而圆的形态, 加药处理后的呈现出扁平、纤薄、体型延长、出现类似伪足的形态, 表明PDGF-BB对HSCs的激活作用还是比较显著的. 最近的一项研究表明, 胆总管结扎引起的小鼠肝纤维化程度不如经PDGF-B抗体处理后的肝纤维化程度严重<sup>[27]</sup>. 此前Czochra等<sup>[28]</sup>通过研究过表达PDGF-B的转基因老鼠, 就已经发现其肝脏的纤维化水平明显提高, 由PDGF-B的高表达及其引发的 $\alpha$ 平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)和PDGFR $\beta$ 的表达升高, 提示肝星状细胞和肌成纤维母细胞的显著激活, 可见PDGF-B是体内促增殖和纤维化的刺激物, 也是促进肝星状细胞进入分化阶段的有效诱导物. 因此, 在PDGF家族中以PDGF-B、PDGF-D和PDGFR $\beta$ 在肝纤维化过程中的作用尤为突出, HSCs表面的PDGF受体以 $\beta$ 受体为主, 并与PDGF-B和-D具有较强的亲和力<sup>[29,30]</sup>.

#### 4 PDGF信号在肝纤维化发病中的机制

肝纤维化的发生主要是因为HSCs的活动引起, 而PDGF作为促分裂和纤维化的最有力生长因子, 参与调节HSCs活化、增生、迁移等过程. PDGF主要在慢性肝损早期间质细胞增生和细胞外基质产生的时候高表达, 而非肝细胞再生时期<sup>[25]</sup>, 且静止期的HSCs无PDGF受体表达, 只有活化的HSCs高表达PDGF受体, 促进肝纤维化的发生和进展<sup>[31]</sup>. 已知NADPH氧化酶(NADPH oxidase, NOX)一直被公认为ROS的主要来源并专职控制细胞内ROS的水平, 参与调节细胞的再生、凋亡等生理活动<sup>[32,33]</sup>. Adachi等<sup>[34]</sup>发现NOX在PDGF调控的离体HSCs的增生及肝纤维化活体模型中发挥关键性作用, NOX是PDGF-BB诱导的HSC内产ROS的主要来源, PDGF-BB可促使HSC中NOX的表达并产生ROS, ROS又经p38MAPK的磷酸化途径促进HSCs的增生, 他们还发现, 经NOX抑制剂DPI处理后, PDGF-BB引起的HSC增生和MAPKs的磷酸化程度显著受到抑制, 进一步说明了PDHG-BB是通过激活NOX/产生ROS的过程以诱导的p38MAPK磷酸化, 将信号传至细胞核内, 调节基因的表达. 肝纤维化形成过程中, PDGF-B、PDGF-D与其敏感受体PDGFR $\beta$ 结合, 受体发生自身磷酸化并激活Ras

系统, 相继通过Raf-1、MEK和ERK(MAPKs通路)的磷酸化激活过程传播信号, 激活的ERK不仅可促进胞质靶蛋白的磷酸化、调节其他蛋白激酶活性, 还可进入细胞核内, 促进多种转录因子(如AP-1、NF- $\kappa$ B)的磷酸化, 使其与相应反应元件的靶基因启动子结合, 增强转录活性, 参与靶基因产物I型胶原、TIMP-1、MMP1、Bcl-2、XIAP等的表达, 调控细胞的分裂、增殖和凋亡<sup>[29,35]</sup>. TIMP-1、MMP1、I型胶原等在肝纤维化过程中是不可或缺的, 活化的HSCs可上调TIMPs的表达, 降低MMPs的表达, 促进胶原的产生, 增加细胞外基质的沉积, 形成瘢痕组织, 破坏肝脏的组织结构和器官功能<sup>[36,37]</sup>.

#### 5 PDGF信号参与其他疾病的发生

慢性纤维化改变可发生在多个不同器官和系统, PDGF信号通路参与形成纤维化的过程, 并在促进肌成纤维细胞的复制, 存活, 和迁移等方面发挥重要作用. 而PDGF的活动与肌成纤维细胞表面表达的PDGFR $\alpha$ 和 $\beta$ PDGF相关, 在纤维化发展过程中, 这些受体被激活继而放大PDGF传递的信号刺激. PDGF参与多个器官的纤维化过程, 包括肺<sup>[38]</sup>、肾<sup>[39]</sup>、肝<sup>[40,41]</sup>、真皮<sup>[42]</sup>和心脏<sup>[43]</sup>等. Nagaoka等<sup>[44]</sup>曾报道称正常人肺泡巨噬细胞中含有PDGF-A和PDGF-B的mRNA, 但PDGF-B比PDGF-A的mRNA多10倍的量, 他们还发现特发性肺纤维化病人的巨噬细胞中, PDGF-A和PDGF-B的mRNA水平都显著提高. 这说明PDGF在特发性肺纤维化病人肺泡巨噬细胞中的大量分泌是由于加快的转录速率, 并且被巨噬细胞释放的PDGF亚基主要是PDGF-B链构成的二聚体<sup>[45]</sup>. Kimani等<sup>[38]</sup>也发现PDGFR $\alpha$ 受体的表达可促进肺肌成纤维细胞的增生, 而PDGF-A对其却有抑制作用. 当然, 在其他的肺疾病中也可发现PDGF的过表达, 例如闭塞性细支气管炎<sup>[46]</sup>、石棉肺<sup>[47]</sup>、尘肺<sup>[48]</sup>等, 且都以PDGF-B链发挥关键作用. PDGF-C缺乏或有其中和抗体的老鼠可削弱经单侧输尿管结扎引起的肾纤维化的程度, 相反的是, PDGF-C对肝脏的纤维化进程影响不明显, 而以PDGF-B、PDGF-D对肝纤维化的影响更显著<sup>[49]</sup>. Liu等<sup>[50]</sup>从硬皮病患者病变处检测到PDGFR $\alpha$ 的表达升高, 受体结合的PDGF-AA配体也相应增加, 促进纤维母细胞的增生及向肌成纤维母细胞的转化. M2巨噬细胞分泌PDGF-CC可诱导口腔和牙龈纤维母细胞表达 $\alpha$ -SMA, 促进该细胞的分化<sup>[51]</sup>. 在心脏受损时,

#### ■名词解释

血小板源性生长因子(PDGF): 在生理状态下, 主要储存于血小板中, 肝脏受损时, 巨噬细胞、血小板、浸润的炎症细胞、受损的内皮细胞及激活的肝星形细胞均可以分泌PDGF, 成为促进有丝分裂因子, 刺激特定细胞群的分裂、增殖.

### ■同行评价

本文对PDGF及其受体在肝纤维化的发生、治疗及其研究进展进行综述,资料详细,内容丰富,条理清晰,可读性强。

可检测到PDGF的表达是提高了, PDGF促进中性粒细胞、巨噬细胞、纤维母细胞和平滑肌细胞等增生和迁移至伤处,刺激肉芽组织的形成,组织结构的纤维化改变<sup>[43]</sup>。

### 6 PDGF与抗肝纤维化

近年来,有一些关于经抗PDGFs、PDGFRs的抗体<sup>[27,52]</sup>或阻断PDGFs、PDGFRs信号通路<sup>[53]</sup>的方法对抗肝纤维化的研究,研究发现注射抗PDGF-B疫苗的小鼠,可抵制CCl<sub>4</sub>药物作用导致的肝纤维化发生,并抑制已发生纤维化的肝脏HSCs的活化、增殖<sup>[54]</sup>。川芎嗪具有削弱纤维化标志基因表达的作用,减少PDGFR $\beta$ 受体的表达,从而阻断PDGFR $\beta$ 下游ERK和p38的磷酸化作用,抑制过氧化物H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的HSCs的活化,并诱导其凋亡<sup>[55]</sup>。苜蓿素、花青素等植物提取物有类似酪氨酸激酶抑制剂活性,通过减少PDGFR $\beta$ 和ERK1/2和Akt的磷酸化作用,抑制PDGF-BB导致的HSCs的活化、增生等<sup>[56,57]</sup>。索拉非尼,作为多重酪氨酸激酶受体抑制剂,针对PDGF受体及Raf/ERK信号通路,能有效治疗肝细胞癌患者,并且在纤维化动物模型中可发挥抗纤维的作用<sup>[58]</sup>。尼洛替尼,也具有酪氨酸受体抑制作用,阻断PDGF和TGF- $\beta$ 诱导的ERK和Akt磷酸化,抑制HSCs的增生、迁移及 $\alpha$ -SMA、胶原蛋白丝的合成<sup>[59]</sup>。实际上,PDGFR抑制剂在疾病的临床前期的运用研究,为抗纤维化的治疗提供了一个新的前景,PDGF受体抑制剂或抗PDGF疫苗很可能是有效预防和减缓肝纤维化的有效制剂。

### 7 结论

许多不同的疾病和毒素都可导致肝损害,长期慢性肝损常常会进展为肝纤维化、肝硬化甚至肝癌,而治疗肝纤维化是非常困难的,如何阻止或逆转肝纤维化的发生、发展成为肝病治疗的重大课题。通过阐述PDGF在肝纤维化中的作用,对PDGF及其受体进行中和或抑制,就可能达到抗纤维化的目的,为抗肝纤维化的治疗提供了一个新的研究方向。

### 8 参考文献

- Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 425-456 [PMID: 21073339 DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130246]
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1655-1669 [PMID: 18471545 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.003]

- Heldin CH. Autocrine PDGF stimulation in malignancies. *Ups J Med Sci* 2012; 117: 83-91 [PMID: 22512244 DOI: 10.3109/03009734.2012.658119]
- Pinzani M, Macias-Barragan J. Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 4: 459-472 [PMID: 20678019 DOI: 10.1586/egh.10.47]
- Chen PH, Chen X, He X. Platelet-derived growth factors and their receptors: Structural and functional perspectives. *Biochim Biophys Acta* 2012 Nov 5. [Epub ahead of print] [PMID: 23137658 DOI: 10.1016/j.bbapap.2012.10.015]
- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008; 22: 1276-1312 [PMID: 18483217 DOI: 10.1101/gad.1653708]
- Yang Y, Yuzawa S, Schlessinger J. Contacts between membrane proximal regions of the PDGF receptor ectodomain are required for receptor activation but not for receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 7681-7686 [PMID: 18505839 DOI: 10.1073/pnas.0802896105]
- Donovan J, Abraham D, Norman J. Platelet-derived growth factor signaling in mesenchymal cells. *Front Biosci* 2013; 18: 106-119 [PMID: 23276912]
- Clement DL, Mally S, Stock C, Lethan M, Satir P, Schwab A, Pedersen SE, Christensen ST. PDGFR $\alpha$  signaling in the primary cilium regulates NHE1-dependent fibroblast migration via coordinated differential activity of MEK1/2-ERK1/2-p90RSK and AKT signaling pathways. *J Cell Sci* 2012 Dec 21. [Epub ahead of print] [PMID: 23264740]
- Kawada K, Upadhyay G, Ferandon S, Janarthanan S, Hall M, Vilardaga JP, Yajnik V. Cell migration is regulated by platelet-derived growth factor receptor endocytosis. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 4508-4518 [PMID: 19528233 DOI: 10.1128/MCB.00015-09]
- Fey D, Croucher DR, Kolch W, Kholodenko BN. Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. *Front Physiol* 2012; 3: 355 [PMID: 23060802 DOI: 10.3389/fphys.2012.00355]
- Wang Y, Jiang XY, Liu L, Jiang HQ. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates hepatic stellate cell apoptosis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5186-5191 [PMID: 18777595]
- Gäbele E, Reif S, Tsukada S, Bataller R, Yata Y, Morris T, Schrum LW, Brenner DA, Rippe RA. The role of p70S6K in hepatic stellate cell collagen gene expression and cell proliferation. *J Biol Chem* 2005; 280: 13374-13382 [PMID: 15677443]
- Tu CT, Li J, Wang FP, Li L, Wang JY, Jiang W. Glycyrrhizin regulates CD4+T cell response during liver fibrogenesis via JNK, ERK and PI3K/AKT pathway. *Int Immunopharmacol* 2012; 14: 410-421 [PMID: 22940540 DOI: 10.1016/j.intimp.2012.08.013]
- Blajicka K, Marinov M, Leitner L, Uth K, Posern G, Arcaro A. Phosphoinositide 3-kinase C2 $\beta$  regulates RhoA and the actin cytoskeleton through an interaction with Dbl. *PLoS One* 2012; 7: e44945 [PMID: 22984590 DOI: 10.1371/journal.pone.0044945]
- Glass DJ. PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 346: 267-278 [PMID: 20593312 DOI: 10.1007/82\_2010\_78]
- Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front Biosci* 2002; 7: d1720-d1726 [PMID: 12133817]

- 18 Ping A, Yihao T, Jingxing D, Minkai C, Hesheng L.  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II mediates platelet-derived growth factor-induced human hepatic stellate cell proliferation. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 935-942 [PMID: 22215519 DOI: 10.1007/s10620-011-2014-2]
- 19 Samajová O, Komis G, Samaj J. Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends Plant Sci* 2013 Jan 3. [Epub ahead of print] [PMID: 23291243 DOI: 10.1016/j.tplants.2012.11.004]
- 20 Chye SM, Tiong YL, Yip WK, Koh RY, Len YW, Seow HF, Ng KY, Ranjit DA, Chen SC. Apoptosis induced by para-phenylenediamine involves formation of ROS and activation of p38 and JNK in Chang liver cells. *Environ Toxicol* 2012 Nov 22. [Epub ahead of print] [PMID: 23172806 DOI: 10.1002/tox.21828]
- 21 Borkham-Kamphorst E, van Roeyen CR, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. *J Hepatol* 2007; 46: 1064-1074 [PMID: 17397961]
- 22 Thieringer F, Maass T, Czochra P, Klopčič B, Conrad I, Friebe D, Schirmacher P, Lohse AW, Blessing M, Galle PR, Teufel A, Kanzler S. Spontaneous hepatic fibrosis in transgenic mice overexpressing PDGF-A. *Gene* 2008; 423: 23-28 [PMID: 18598744 DOI: 10.1016/j.gene.2008.05.022]
- 23 Breitkopf K, Roeyen Cv, Sawitz A, Wickert L, Floege J, Gressner AM. Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC). *Cytokine* 2005; 31: 349-357 [PMID: 16039137]
- 24 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 U S A* 2005; 102: 3389-3394 [PMID: 15728360]
- 25 Borkham-Kamphorst E, Kovalenko E, van Roeyen CR, Gassler N, Bomble M, Ostendorf T, Floege J, Gressner AM, Weiskirchen R. Platelet-derived growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. *Lab Invest* 2008; 88: 1090-1100 [PMID: 18663351 DOI: 10.1038/labinvest.2008.71]
- 26 Li L, Li J, Wang JY, Yang CQ, Jia ML, Jiang W. Role of RhoA in platelet-derived growth factor-BB-induced migration of rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 2010; 123: 2502-2509 [PMID: 21034618]
- 27 Ogawa S, Ochi T, Shimada H, Inagaki K, Fujita I, Nii A, Mofat MA, Katragadda M, Violand BN, Arch RH, Masferrer JL. Anti-PDGF-B monoclonal antibody reduces liver fibrosis development. *Hepatology* 2010; 40: 1128-1141 [PMID: 20880061 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2010.00718.x]
- 28 Czochra P, Klopčič B, Meyer E, Herkel J, Garcia-Lazaro JF, Thieringer F, Schirmacher P, Biesterfeld S, Galle PR, Lohse AW, Kanzler S. Liver fibrosis induced by hepatic overexpression of PDGF-B in transgenic mice. *J Hepatol* 2006; 45: 419-428 [PMID: 16842882]
- 29 Borkham-Kamphorst E, Herrmann J, Stoll D, Treppe J, Gressner AM, Weiskirchen R. Dominant-negative soluble PDGF-beta receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. *Lab Invest* 2004; 84: 766-777 [PMID: 15077122]
- 30 Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 413-423 [PMID: 15358192]
- 31 Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 255-273 [PMID: 15207816]
- 32 Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1797: 897-906 [PMID: 20122895 DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.01.032]
- 33 Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev* 2011; 63: 218-242 [PMID: 21228261 DOI: 10.1124/pr.110.002980]
- 34 Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1272-1281 [PMID: 15915457]
- 35 Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 396-405 [PMID: 20079433 DOI: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009]
- 36 Mann DA, Marra F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2010; 52: 949-950 [PMID: 20395006 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.02.005]
- 37 Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP. Reversibility of liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012 Jun 6; 5 Suppl 1: S26. [Epub ahead of print] [PMID: 23259590]
- 38 Kimani PW, Holmes AJ, Grossmann RE, McGowan SE. PDGF-Ralpha gene expression predicts proliferation, but PDGF-A suppresses transdifferentiation of neonatal mouse lung myofibroblasts. *Respir Res* 2009; 10: 119 [PMID: 19939260 DOI: 10.1186/1465-9921-10-119]
- 39 Farris AB, Colvin RB. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21: 289-300 [PMID: 22449945 DOI: 10.1097/MNH.0b013e3283521cfa]
- 40 Thoen LF, Guimarães EL, Dollé L, Mannaerts I, Najimi M, Sokal E, van Grunsven LA. A role for autophagy during hepatic stellate cell activation. *J Hepatol* 2011; 55: 1353-1360 [PMID: 21803012 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.07.010]
- 41 Guyot C, Lepreux S, Combe C, Sarrazay V, Billet F, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Desmoulière A. Fibrogenic cell phenotype modifications during remodeling of normal and pathological human liver in cultured slices. *Liver Int* 2010; 30: 1529-1540 [PMID: 20846345 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2010.02342.x]
- 42 Reich N, Maurer B, Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Zerr P, Palumbo K, Zwerina J, Nevskaya T, Gay S, Distler O, Schett G, Distler JH. The transcription factor Fra-2 regulates the production of extracellular matrix in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 280-290 [PMID: 20039427 DOI: 10.1002/art.25056]
- 43 Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res* 2010; 106: 1675-1680 [PMID: 20538689 DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.217737]
- 44 Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG. Upregulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene



- expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1990; 85: 2023-2027 [PMID: 2347924]
- 45 Kogan EA, Tyong FV, Demura SA. [The mechanism of lung tissue remodeling in the progression of idiopathic pulmonary fibrosis]. *Arkh Patol* 2010; 72: 30-36 [PMID: 21086635]
  - 46 Alho HS, Maasilta PK, Vainikka T, Salminen US. Platelet-derived growth factor, transforming growth factor-beta, and connective tissue growth factor in a porcine bronchial model of obliterative bronchiolitis. *Exp Lung Res* 2007; 33: 303-320 [PMID: 17694440]
  - 47 Li Y, Karjalainen A, Koskinen H, Vainio H, Pukkala E, Hemminki K, Brandt-Rauf PW. Serum growth factors in asbestosis patients. *Biomarkers* 2009; 14: 61-66 [PMID: 19283526 DOI: 10.1080/13547500802676868]
  - 48 Wang GZ, Wang MJ, Liu LH, Wang JH, Qin WH, Liu Y, He JF. [The surface biomarkers of sputum cells in coal mine workers and patients with pneumoconiosis]. *Zhonghua Laodong Weisheng Zhiyebing Zazhi* 2011; 29: 837-840 [PMID: 22468294]
  - 49 Martin IV, Borkham-Kamphorst E, Zok S, van Roeyen CR, Eriksson U, Boor P, Hittatiya K, Fischer HP, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Eitner F, Floege J, Ostendorf T. Platelet-derived growth factor (PDGF)-C neutralization reveals differential roles of PDGF receptors in liver and kidney fibrosis. *Am J Pathol* 2013; 182: 107-117 [PMID: 23141925 DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.09.006]
  - 50 Liu T, Zhang J. [Role of PDGF-A/PDGFR- $\alpha$  in proliferation and transdifferentiation of fibroblasts from skin lesions of patients with systemic sclerosis]. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* 2012; 32: 496-501 [PMID: 22543129]
  - 51 Glim JE, Niessen FB, Everts V, van Egmond M, Beelen RH. Platelet derived growth factor-CC secreted by M2 macrophages induces alpha-smooth muscle actin expression by dermal and gingival fibroblasts. *Immunobiology* 2012 Oct 26. [Epub ahead of print] [PMID: 23182716 DOI: 10.1016/j.imbio.2012.10.004]
  - 52 Mahlknecht P, Stemmerger S, Sprenger F, Rainer J, Hametner E, Kirchmair R, Grabmer C, Scherfler C, Wenning GK, Seppi K, Poewe W, Reindl M. An antibody microarray analysis of serum cytokines in neurodegenerative Parkinsonian syndromes. *Proteome Sci* 2012; 10: 71 [PMID: 23173604 DOI: 10.1186/1477-5956-10-71]
  - 53 Hou X, Kumar A, Lee C, Wang B, Arjunan P, Dong L, Maminishkis A, Tang Z, Li Y, Zhang F, Zhang SZ, Wardega P, Chakrabarty S, Liu B, Wu Z, Colosi P, Fariss RN, Lennartsson J, Nussenblatt R, Gutkind JS, Cao Y, Li X. PDGF-CC blockade inhibits pathological angiogenesis by acting on multiple cellular and molecular targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 12216-12221 [PMID: 20566880 DOI: 10.1073/pnas.1004143107]
  - 54 Hao ZM, Fan XB, Li S, Lv YF, Su HQ, Jiang HP, Li HH. Vaccination with platelet-derived growth factor B kinoids inhibits CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 342: 835-842 [PMID: 22711911 DOI: 10.1124/jpet.112.194357]
  - 55 Zhang F, Ni C, Kong D, Zhang X, Zhu X, Chen L, Lu Y, Zheng S. Ligustrazine attenuates oxidative stress-induced activation of hepatic stellate cells by interrupting platelet-derived growth factor- $\beta$  receptor-mediated ERK and p38 pathways. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 265: 51-60 [PMID: 23022513 DOI: 10.1016/j.taap.2012.09.016]
  - 56 Seki N, Toh U, Kawaguchi K, Ninomiya M, Koketsu M, Watanabe K, Aoki M, Fujii T, Nakamura A, Akagi Y, Kusukawa J, Kage M, Shirouzu K, Yamana H. Tricin inhibits proliferation of human hepatic stellate cells in vitro by blocking tyrosine phosphorylation of PDGF receptor and its signaling pathways. *J Cell Biochem* 2012; 113: 2346-2355 [PMID: 22359269 DOI: 10.1002/jcb.24107]
  - 57 Choi JH, Hwang YP, Park BH, Choi CY, Chung YC, Jeong HG. Anthocyanins isolated from the purple-fleshed sweet potato attenuate the proliferation of hepatic stellate cells by blocking the PDGF receptor. *Environ Toxicol Pharmacol* 2011; 31: 212-219 [PMID: 21787688 DOI: 10.1016/j.etap.2010.10.011]
  - 58 Wang Y, Gao J, Zhang D, Zhang J, Ma J, Jiang H. New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Hepatol* 2010; 53: 132-144 [PMID: 20447716 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.02.027]
  - 59 Liu Y, Wang Z, Kwong SQ, Lui EL, Friedman SL, Li FR, Lam RW, Zhang GC, Zhang H, Ye T. Inhibition of PDGF, TGF- $\beta$ , and Abl signaling and reduction of liver fibrosis by the small molecule Bcr-Abl tyrosine kinase antagonist Nilotinib. *J Hepatol* 2011; 55: 612-625 [PMID: 21251937 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.11.035]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



# 肠道菌群参与结直肠癌发生的模式

贾盛佼, 王莉莉, 于新娟, 董开芯, 田字彬, 董全江

贾盛佼, 王莉莉, 于新娟, 董开芯, 董全江, 青岛大学医学院附属青岛市中心医院消化内科及中心实验室 山东省青岛市 266071  
田字彬, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003  
贾盛佼, 主要从事胃肠道菌群与消化系统肿瘤的基础与临床研究.  
作者贡献分布: 本文综述由贾盛佼完成; 资料查阅与分析由王莉莉、于新娟及董开芯完成; 董全江与田字彬审校.  
通讯作者: 董全江, 教授, 主任医师, 266071, 山东省青岛市东海中路5号, 青岛大学医学院附属青岛市中心医院消化内科及中心实验室, jiangacer@126.com  
电话: 0532-88905289  
收稿日期: 2013-01-24 修回日期: 2013-02-05  
接受日期: 2013-02-20 在线出版日期: 2013-03-28

## Mechanisms underlying the role of intestinal microbiota in pathogenesis of colorectal cancer

Sheng-Jiao Jia, Li-Li Wang, Xin-Juan Yu, Kai-Xin Dong, Zi-Bin Tian, Quan-Jiang Dong

Sheng-Jiao Jia, Li-Li Wang, Xin-Juan Yu, Kai-Xin Dong, Quan-Jiang Dong, Department of Gastroenterology, Department of Central Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China  
Zi-Bin Tian, Department of Gastroenterology, Hospital Affiliated to Medical College of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China  
Correspondence to: Quan-Jiang Dong, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, Department of Central Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, Medical College of Qingdao University, 5 Donghai Middle Road, Qingdao 266071, Shandong Province, China. jiangacer@126.com  
Received: 2013-01-24 Revised: 2013-02-05  
Accepted: 2013-02-20 Published online: 2013-03-28

## Abstract

The homeostatic equilibrium of the intestinal microbiota plays a key role in digestion, assimilation, immuno-inflammatory reactions, regulation of intestinal epithelial proliferation, and resistance to infection. Under the influence of internal and external factors, some pathogens alter in number and functions. This directly or indirectly affects the intestinal epithelium and the enteric environment, which is closely associated with the pathogenesis of colorectal cancer. This paper summarizes the characteristics of

the normal intestinal microbiota, describes the “alpha-bug” hypothesis and the “driver-passenger” model, and discusses the adaptive alteration of the intestinal microbiota from a dynamic perspective. This will aid us in understanding the pathogenesis of colorectal cancer, providing a theoretical basis for the prevention and treatment of this disease.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Intestinal microbiota; Colorectal cancer; Pathogenesis

Jia SJ, Wang LL, Yu XJ, Dong KX, Tian ZB, Dong QJ. Mechanisms underlying the role of intestinal microbiota in pathogenesis of colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 779-784 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/779.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.779>

## 摘要

健康状态下肠道菌群与人体和肠道微环境维持平衡状态, 对食物的消化吸收、调节肠道上皮细胞增殖、抵抗病原体和炎症免疫反应等具有重要意义. 在体内外因素影响下某些细菌先后发生数目及功能的变化引起肠道菌群改变进而影响肠上皮细胞和肠腔环境, 与结直肠癌的发生发展密切相关. 本文对肠道正常菌群特征作一综述, 并深入分析了菌群-结直肠癌的两个发病模型 “Alpha-bug” 和 “driver-passenger”, 从菌群动态变化的角度探讨了肠道菌群在结直肠癌发生发展中的适应性变化和致病机制, 有利于深入理解结直肠癌发病机制, 并为指导临床治疗及预防工作提供了理论依据.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 肠道菌群; 结直肠癌; 发病机制

贾盛佼, 王莉莉, 于新娟, 董开芯, 田字彬, 董全江. 肠道菌群参与结直肠癌发生的模式. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 779-784 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/779.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.779>

## ■背景资料

肠道菌群与结直肠癌的发生发展密切相关. 许多学者根据动物模型实验及高通量测序技术研究结果提出菌群在结直肠癌中作用的模型, 但由于研究和模型的局限性, 菌群的具体作用机制及其动态变化仍待进一步研究和探索.

## ■同行评议者

谭周进, 教授, 湖南中医药大学; 吴军, 研究员, 军事医学科学院生物工程研究所

## ■ 研发前沿

目前通过高通量测序技术已基本阐明肠道菌群的构成,对肠道菌群具体致病机制的研究仍处于初级阶段,大部分局限于肿瘤某一阶段一种或几种致病菌对肿瘤的作用。肠道菌群在结直肠癌发生发展中的动态变化及其作用机制仍不明确。

## 0 引言

结直肠癌是全世界最常见的癌症之一,每年都有超过一百万的新发病例,并且每年死亡人数达六十多万<sup>[1-3]</sup>。细菌感染和病毒感染与肿瘤发生密切相关<sup>[4-8]</sup>,20世纪70年代,Aries等<sup>[9]</sup>对人体肠道复杂共生菌与结直肠癌的关系进行了研究并提出两者之间存在相关关系的假设。此后动物模型实验研究更加深了人们对菌群与结直肠癌关系的理解<sup>[10-12]</sup>。近年来应用高通量测序技术可以更为深入直观的研究人体正常及病理肠黏膜中的菌群构成<sup>[13-15]</sup>。许多研究者提出关于菌群在结直肠癌中作用的模型<sup>[16-19]</sup>。虽然这些模型从不同角度阐述了菌群在结直肠癌发生发展中的作用及菌群构成演变,但由于这些模型的局限性,菌群的具体作用机制及菌群在结直肠癌的影响下所发生的变化仍待进一步研究和探索。本文深入分析了新近提出的菌群-结直肠癌的两个发病模型,从菌群动态变化的角度探讨了肠道菌群在结直肠癌发生发展中的适应性变化和致病机制,有利于深入理解结直肠癌发病机制,为指导临床预防及治疗工作提供理论依据。

## 1 人体正常肠道菌群

从出生起,人的胃肠道黏膜就有大量细菌开始定植。成年后,人体胃肠道存在10倍于人体细胞数量的细菌。由于大肠内容物移动缓慢,且其厌氧环境呈中性或弱碱性,有利于细菌的大量繁殖,因此整个胃肠道细菌最多的部位在大肠<sup>[20,21]</sup>。菌群定居于肠道黏膜表面,与宿主形成有机统一的整体<sup>[22]</sup>。人体胃肠道菌群数目庞大,大约有 $10^{14}$ ,构成复杂,至少有1 000个不同种类<sup>[23,24]</sup>。高通量测序技术检测出人体肠道菌群主要有7大门组成:厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、梭杆菌门、疣微球菌门、与蓝菌门较接近的未分类菌群<sup>[25]</sup>。加上之前已经鉴定出的螺旋体门和VadinBE97门,到目前为止人体肠道内已发现的细菌共有9个门<sup>[26]</sup>。大部分肠道菌属于厚壁菌门和拟杆菌门(占98%以上的序列),且大多数(95%)的厚壁菌属于梭菌纲。拟杆菌门中的拟杆菌属是粪便中的主要微生物<sup>[25]</sup>。早在20世纪70年代便有研究者发现肠道菌群有助于肠道的发育成熟、宿主消化食物及营养摄取和抵抗病原体<sup>[27]</sup>。近年来的研究发现肠道菌群还具有调节肠道上皮细胞增殖<sup>[28]</sup>、宿主能量代谢<sup>[29]</sup>和炎症免疫反应<sup>[30]</sup>的特点。庞大而复杂的肠道菌群通过长期进化以及与宿主的相互适应,在细菌、

环境和宿主之间达到平衡状态,一旦宿主免疫力改变、环境变化等因素引起这种平衡态破坏,肠道菌群结构改变造成肠道微环境的变化,损伤肠上皮细胞,导致过敏性疾病<sup>[31]</sup>、炎症性肠病及癌症<sup>[12,13]</sup>等疾病的发生。肠道菌群对结直肠癌的作用亦即通过上述机制发生的。

人体肠道菌群具有多样性、稳定性及可复性,其在菌群生态平衡的建立、维持及平衡破坏后的修复中均有重要体现<sup>[32]</sup>。菌群的多样性促成其稳定性,即菌群生态平衡不易被打破,而一旦由于环境改变、宿主免疫功能变化等引起平衡的破坏后,菌群的可复性特性会促使菌群恢复到原平衡态或达到另外一个平衡态<sup>[32]</sup>。结直肠癌中肠道菌群平衡态的改变是一种被动的适应性的变化,体现了菌群对结直肠癌发生发展有促进或抑制作用。

## 2 “Alpha-bug”模型

Sears和Pardoll<sup>[16]</sup>通过对肠产毒性脆弱拟杆菌(*enterotoxigenic Bacteroides fragilis*, ETBF)的致病作用与机制的研究提出了“Alpha-bug”模型。该模型认为某种或某些特定肠道固有细菌通过直接或间接方式影响肠上皮细胞,使其易发生基因突变,这些肠道固有菌被定义为“Alpha-bugs”。其直接作用包括分泌毒素蛋白直接促癌作用等,间接作用包括改变结肠菌群使其更易引起黏膜免疫反应和结肠上皮细胞的变化。当上皮细胞基因突变累积到一定程度时诱发结直肠癌。在整个过程中,“Alpha-bugs”一直存在或其作用一直存在,并将其他益生菌“排挤”掉,同时菌群的改变也促使许多共同致病菌的出现,加速结直肠癌的发生与发展。该模型以ETBF为例,ETBF通过分泌脆弱拟杆菌毒素激发了结肠上皮细胞和黏膜免疫功能的重要改变进而促进了肠黏膜癌变,同时也改变了肠腔内的环境,出现了许多共同致病菌。结肠上皮的改变包括Wnt、NF- $\kappa$ B、Stat3等信号转导通路的激活<sup>[2,33,34]</sup>,结肠上皮细胞DNA的损伤等,后者可能是通过脆弱拟杆菌毒素对结肠上皮细胞的直接致癌作用<sup>[35]</sup>或炎症细胞释放的活化氧或氢类<sup>[36]</sup>的间接致癌作用实现的。黏膜免疫学的变化主要为Th17介导的免疫反应<sup>[37]</sup>,该反应可能与结肠上皮细胞的改变具有协同致癌作用。

“Alpha-bug”模型不仅深入分析了单一细菌或特定致病菌的作用,而且也提出了菌群的致病作用:特定致病菌诱导癌症发生过程中,



许多其他益生菌被“排挤”, 菌群的变化促使多种共同致病菌出现, 对癌症的发生与发展产生相同或相似的促进作用. 这为认识癌症或其他慢性免疫性疾病的发生提供了新思路. 但该模型仍存在许多需要探讨的问题: (1)该模型是通过分析ETBF对结直肠癌的致病作用而得出的, 缺少其他“Alpha-bugs”的论证说明, 需要更多的研究证实; (2)该模型提出菌群而非单一致病菌的致癌观点, 但肠道菌群发生何种改变, 共同致病菌以及被“排挤”的益生菌有哪些, 发生这些变化的机制如何, 这些问题尚不清楚; (3)该模型侧重探讨了ETBF在结直肠癌中的作用机制, 但是ETBF和继发出现的共同致病菌的作用时限以及各自的数目变化尚不明确.

### 3 “driver-passenger”模型

新近有3次研究运用高通量测序技术进行了菌群与结直肠癌的关系的探讨, 结果发现结直肠癌患者的肿瘤组织肠黏膜和周围正常组织肠黏膜的菌群存在很大差异<sup>[13-15]</sup>. 其中Marchesi等<sup>[13]</sup>研究发现肿瘤组织黏膜中*Coriobacteria*等具有益生菌特性的肠道共生菌高表达, 而潜在致病菌如大肠杆菌等的表达较低. 肿瘤周围正常组织黏膜中致病菌含量反而高于肿瘤组织. 由此, Tjalsma等<sup>[17]</sup>首次提出肠道菌群致癌的“driver-passenger”模型: 首先, 某些特定的肠道固有菌诱发了上皮细胞DNA损伤, 这些肠道固有菌被定义为“drivers”; 其次, 癌变过程介导了肠道微环境的改变, 这种改变有利于另外某些细菌的增殖存活, 这些细菌被定义为“passengers”.

该模型与“Alpha-bug”模型明显不同. 他强调由于肿瘤生长, 肠道微环境发生变化, “passengers”取代“drivers”而定植于肿瘤微环境中. 该模型列举了几种研究较多的“drivers”, 他们通过不同的机制促进了大肠的癌变过程. 例如: 粪肠球菌产生的胞外超氧化物转化为过氧化氢, 引起结肠上皮细胞的DNA损伤<sup>[38,39]</sup>; 某些大肠杆菌菌株的*pks*基因能编码*colibactin*蛋白, 这种基因毒性产物能够诱发DNA单链的损伤<sup>[40,41]</sup>; ETBF通过脆弱拟杆菌毒素直接作用于结肠上皮细胞, 同时通过引起免疫炎症反应促进结直肠癌的发生<sup>[35,42,43]</sup>; 肠杆菌科如志贺菌、柠檬杆菌、沙门菌等通过在肠道内的持续低水平定植引起结肠黏膜的无症状持续炎症反应, 同时产生可以引起结肠上皮细胞DNA损伤的基因毒性物质, 从而增加了个体对结直

肠癌的易感性<sup>[36,44]</sup>. 该模型的创新点在于“passengers”概念的提出, 与之前研究理论不同, 该模型认为结直肠癌发生后, 原发致病菌(“drivers”)会被一些更适宜在肠道肿瘤微环境中生存的机会性致病菌甚至益生菌所替代, 这些替代者被定义为“passengers”, 如梭杆菌<sup>[13-15]</sup>、解链食子酸链球菌亚种<sup>[45]</sup>、氏菌属<sup>[13]</sup>等. “passengers”既对肿瘤的进展有促进作用又不排除其具保护肠道内环境的益生菌效应. “driver-passenger”模型较好的解释了结直肠癌患者肿瘤组织与正常组织肠黏膜菌群的差异. 但该模型仍存在其局限性: (1)该模型参考的3项研究<sup>[13-15]</sup>的受试对象均为结直肠癌晚期患者, 缺少健康及癌症早期对照, 因此只能反映在癌症发展晚期的肠道菌群构成; (2)尽管这3项研究均分析了菌群种类、构成、丰度等, 但所有的实验方法都只是用来检测细菌的有无, 细菌之间的基因组差异造成的基因产物(如毒力因子)对肠道上皮的影响尚不明确.

### 4 结直肠癌发生发展过程中肠道菌群的适应性变化

健康状态下, 肠道菌群与人体和肠道微环境保持着平衡状态. 当机体受到某些内因或外因的作用如不合理饮食、感染、应激等, 发生肠道菌群失调, 这表现为肠道菌群的种类、数量、比例、定位和代谢特征等的变化<sup>[46]</sup>. 如给予小鼠致肥胖饮食处理后发现, 小鼠的远端肠道菌群中的厚壁菌门柔膜体纲的分支细菌数目明显增多<sup>[46]</sup>, 体现了菌群的被动性改变以适应周围环境的变化. 对无结肠袋炎的溃疡性结肠炎患者组, 患结肠袋炎的溃疡性结肠炎患者组以及家族性腺瘤息肉病患者组的结肠袋黏膜菌群研究结果显示3组的菌群构成明显不同, 其中患结肠袋炎的溃疡性结肠炎患者的梭菌属、真菌属较多, 而且患结肠袋炎的溃疡性结肠炎患者组与家族性腺瘤息肉病患者组相比, 其拟杆菌门及变形菌门较后者少, 厚壁菌门及疣微菌门较后者多<sup>[47]</sup>. 此结果反映了肠道菌群是随疾病的发生发展而不断变化的. 结直肠癌的“腺瘤-癌序列”模型假设基因突变的发生及积累促使结肠上皮增生和畸变, 最终导致结直肠癌<sup>[18,19]</sup>. 由此, 结直肠癌的发生是一个漫长的过程, 肠上皮细胞经历了“正常-过度增生-腺瘤-癌”的演变, 在此过程中, 菌群有可能呈现动态变化, 反复出现新的平衡, 我们可以称之为适应性变化.

### ■ 相关报道

近年来许多学者提出关于肠道菌群在结直肠癌中作用的模型, 这些模型从不同角度阐述了肠道菌群在结直肠癌发生发展中的作用及菌群构成演变, 但各模型之间仍存在争议, 菌群的具体致病机制以及菌群自身动态变化仍不明确.

## ■创新盘点

本文深入分析了新近提出的菌群-结直肠癌的两个发病模型,从菌群动态变化的角度探讨肠道菌群在结直肠癌发生发展中的适应性变化和致病机制,而不局限于分析结直肠癌某一阶段一种或几种致病菌对肿瘤的作用。

菌群的适应性变化与菌群自身的可复性有关。生态系统的可复性反映了一个系统在向另一个平衡状态改变之前可以承受的压力或波动的大小<sup>[48]</sup>。定居于人体肠道中数以亿计的细菌构成了一个复杂的生态系统,因此肠道菌群也具有可复性<sup>[32]</sup>。当菌群受到体内外各种刺激时,现有平衡状态被打破,可复性使菌群具有向平衡状态改变的倾向。

“driver-passenger”模型与“Alpha-bug”模型的不同之处在于前者提出了“drivers”被“passengers”取代,其依据是结直肠癌晚期患者的菌群分析<sup>[13-15]</sup>,但对于肿瘤发生发展过程中的其他阶段如肠上皮过度增生以及腺瘤阶段菌群如何并未分析讨论,亦即忽略了探讨在结直肠癌发生发展过程中细菌的存在及其作用是否会随着肠道微环境以及菌群的动态性变化而改变。菌群的适应性变化则可以从结直肠癌发生发展的纵向角度更合理地解释结直肠癌发生发展过程中肠道菌群的变化过程:健康状态下人体肠道菌群保持平衡状态,遗传、饮食、环境等多方面因素导致肠道中容易诱发结直肠癌的致病菌占优势,作用增强,因此该部分细菌对结直肠癌发挥主动性致病作用诱发癌症的发生。而肿瘤的生长使结肠黏膜屏障功能改变,结肠上皮细胞损伤、流血等改变了局部微环境<sup>[49]</sup>,使原有菌群平衡态被打破,菌群可复性使整个菌群不断发展向更适合改变了的肠道微环境的平衡态。在此发展过程中较适合此环境的细菌增殖,不适于在此环境中存活的细菌便减少甚至消失,由此所形成的新的平衡态反映了菌群对结直肠癌的作用。若具有促癌特征的细菌占优势则菌群能促进肿瘤的发生发展;反之,若抑癌菌占优势则菌群对肿瘤的发生发展具有抑制作用。如“driver-passenger”模型中,“drivers”的数目减少或消失以及“passengers”的出现是由于新的平衡态的需要,若“drivers”能够适应新的环境并在新的平衡态中具备相应的功能,则“drivers”便不会被“passengers”排挤掉,而是可以继续肠道中定植并发挥一定作用。

菌群的适应性变化是从动态的角度分析肠道菌群在结直肠癌中的变化而非局限于某一种或某几种细菌的改变,更符合菌群在人体肠道内的存在状态,因此从菌群的适应性变化角度分析讨论肠道菌群对结直肠癌的影响更为合理。但是肠道微环境的改变如何、菌群平衡态具体构成及两者之间存在何种关系仍待进一步研究

探讨。

## 5 结论

肠道菌群与结直肠癌密切相关。探究肠道菌群在结直肠癌发生发展中所起的作用有助于加深我们对结直肠癌发病机制的理解,从而更好地指导临床预防及治疗工作。但目前关于肠道细菌对结直肠癌的作用的研究大都局限于肿瘤某一阶段一种或几种致病菌对肿瘤的作用,对于肠道菌群在结直肠癌发生发展过程中的动态变化及致病机制仍不明确;菌群适应性变化中涉及到的肠道微环境的改变、菌群平衡态具体构成以及两者之间的关系亦不清晰,这些问题有待进一步研究探索。随着这些问题的解决,我们将更加全面深刻的认识人体肠道菌群对结直肠癌的作用机制以及菌群在肿瘤影响下自身的发展变化,这将会为临床预防及治疗结直肠癌提供有力的理论指导。

## 6 参考文献

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917 [PMID: 21351269 DOI: 10.1002/ijc.25516]
- 2 Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 2449-2460 [PMID: 20018966 DOI: 10.1056/NEJMra0804588]
- 3 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90 [PMID: 21296855 DOI: 10.3322/caac.20107]
- 4 Dalton-Griffin L, Kellam P. Infectious causes of cancer and their detection. *J Biol* 2009; 8: 67 [PMID: 19678917 DOI: 10.1186/jbiol168]
- 5 Collins D, Hogan AM, Winter DC. Microbial and viral pathogens in colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12: 504-512 [PMID: 21067973 DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70186-8]
- 6 Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118: 3030-3044 [PMID: 16404738]
- 7 Mager DL. Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review. *J Transl Med* 2006; 4: 14 [PMID: 16566840]
- 8 Rowland IR. The role of the gastrointestinal microbiota in colorectal cancer. *Curr Pharm Des* 2009; 15: 1524-1527 [PMID: 19442169]
- 9 Aries V, Crowther JS, Drasar BS, Hill MJ, Williams RE. Bacteria and the aetiology of cancer of the large bowel. *Gut* 1969; 10: 334-335 [PMID: 5771664]
- 10 Dove WF, Clipson L, Gould KA, Luongo C, Marshall DJ, Moser AR, Newton MA, Jacoby RF. Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status. *Cancer Res* 1997; 57: 812-814 [PMID: 9041176]
- 11 Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA,

- Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998; 66: 5224-5231 [PMID: 9784526]
- 12 Uronis JM, Mühlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS, Jobin C. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One* 2009; 4: e6026 [PMID: 19551144 DOI: 10.1371/journal.pone.0006026]
  - 13 Marchesi JR, Dutilh BE, Hall N, Peters WH, Rølofs R, Boleij A, Tjalsma H. Towards the human colorectal cancer microbiome. *PLoS One* 2011; 6: e20447 [PMID: 21647227 DOI: 10.1371/journal.pone.0020447]
  - 14 Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, Ojesina AI, Jung J, Bass AJ, Taberner J, Baselga J, Liu C, Shivdasani RA, Ogino S, Birren BW, Huttenhower C, Garrett WS, Meyerson M. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22: 292-298 [PMID: 22009990 DOI: 10.1101/gr.126573.111]
  - 15 Castellari M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J, Barnes R, Watson P, Allen-Vercos E, Moore RA, Holt RA. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22: 299-306 [PMID: 22009989 DOI: 10.1101/gr.126516.111]
  - 16 Sears CL, Pardoll DM. Perspective: alpha-bugs, their microbial partners, and the link to colon cancer. *J Infect Dis* 2011; 203: 306-311 [PMID: 21208921 DOI: 10.1093/jinfdis/jiq061]
  - 17 Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, Dutilh BE. A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 575-582 [PMID: 22728587 DOI: 10.1038/nrmicro2819]
  - 18 Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-141 [PMID: 8516849]
  - 19 Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 479-507 [PMID: 21090969 DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130235]
  - 20 Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292: 1115-1118 [PMID: 11352068]
  - 21 Tlaskalová-Hogenová H, Stěpanková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tučková L, Rossmann P, Hrnčíř T, Kverka M, Zákostelská Z, Klimešová K, Příbylová J, Bártová J, Sanchez D, Fundová P, Borovská D, Srůtková D, Zidek Z, Schwarzer M, Drastich P, Funda DP. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol* 2011; 8: 110-120 [PMID: 21278760 DOI: 10.1038/cmi.2010.67]
  - 22 Rossi O, van Baaren P, Wells JM. Host-Recognition of Pathogens and Commensals in the Mammalian Intestine. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011 Dec 17. [Epub ahead of print] [PMID: 22179258]
  - 23 Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59-65 [PMID: 20203603 DOI: 10.1038/nature08821]
  - 24 Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* 2006; 21: 517-523 [PMID: 16820245]
  - 25 Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635-1638 [PMID: 15831718]
  - 26 Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124: 837-848 [PMID: 16497592]
  - 27 Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977; 31: 107-133 [PMID: 334036]
  - 28 Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118: 229-241 [PMID: 15260992]
  - 29 Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 15718-15723 [PMID: 15505215]
  - 30 Noverr MC, Huffnagle GB. Does the microbiota regulate immune responses outside the gut? *Trends Microbiol* 2004; 12: 562-568 [PMID: 15539116]
  - 31 Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 2005; 307: 1920-1925 [PMID: 15790845]
  - 32 Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012; 489: 220-230 [PMID: 22972295 DOI: 10.1038/nature11550]
  - 33 Sears CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 349-369 [PMID: 19366918 DOI: 10.1128/CMR.00053-08]
  - 34 Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 41-51 [PMID: 17186030]
  - 35 Goodwin AC, Destefano Shields CE, Wu S, Huso DL, Wu X, Murray-Stewart TR, Hacker-Prietz A, Rabizadeh S, Woster PM, Sears CL, Casero RA. Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 15354-15359 [PMID: 21876161 DOI: 10.1073/pnas.1010203108]
  - 36 Housseau F, Sears CL. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* (ETBF)-mediated colitis in Min (Apc<sup>+/+</sup>) mice: a human commensal-based murine model of colon carcinogenesis. *Cell Cycle* 2010; 9: 3-5 [PMID: 20009569]
  - 37 Wu S, Rhee KJ, Albesiano E, Rabizadeh S, Wu X, Yen HR, Huso DL, Brancati FL, Wick E, McAllister F, Housseau F, Pardoll DM, Sears CL. A human

# 名词解释

肠产毒性脆弱拟杆菌(ETBF): 脆弱拟杆菌的一种类型, 肠脆弱拟杆菌为革兰阴性专性厌氧菌, 可分为产肠毒素和非产肠毒素两种类型。肠产毒性脆弱拟杆菌可分泌脆弱拟杆菌肠毒素至菌体细胞外引起组织细胞损伤。



## ■同行评价

本文重点对肠道菌群与结直肠癌发生发展相互作用的两个模型进行介绍,对相关研究具有一定的参考价值。

- colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. *Nat Med* 2009; 15: 1016-1022 [PMID: 19701202 DOI: 10.1038/nm.2015]
- 38 Wang X, Huycke MM. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* promotes chromosomal instability in mammalian cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 551-561 [PMID: 17258726]
- 39 Wang X, Allen TD, May RJ, Lightfoot S, Houchen CW, Huycke MM. *Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect. *Cancer Res* 2008; 68: 9909-9917 [PMID: 19047172 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1551]
- 40 Nougayrède JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006; 313: 848-851 [PMID: 16902142]
- 41 Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayrède JP. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 11537-11542 [PMID: 20534522 DOI: 10.1073/pnas.1001261107]
- 42 Wu S, Shin J, Zhang G, Cohen M, Franco A, Sears CL. The *Bacteroides fragilis* toxin binds to a specific intestinal epithelial cell receptor. *Infect Immun* 2006; 74: 5382-5390 [PMID: 16926433]
- 43 Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, Soyletir G. A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 782-786 [PMID: 16842574]
- 44 Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231-234 [PMID: 16648837]
- 45 Klein RS, Recco RA, Catalano MT, Edberg SC, Casey JL, Steigbigel NH. Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *N Engl J Med* 1977; 297: 800-802 [PMID: 408687]
- 46 Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2008; 3: 213-223 [PMID: 18407065 DOI: 10.1016/j.chom.2008.02.015]
- 47 Zella GC, Hait EJ, Glavan T, Gevers D, Ward DV, Kitts CL, Korzenik JR. Distinct microbiome in pouchitis compared to healthy pouches in ulcerative colitis and familial adenomatous polyposis. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1092-1100 [PMID: 20845425 DOI: 10.1002/ibd.21460]
- 48 Folke C. Reserves and resilience—from single equilibrium to complex systems. *Ambio* 2003; 32: 379 [PMID: 14627364]
- 49 Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esumi H, Soga T. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res* 2009; 69: 4918-4925 [PMID: 19458066 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4806]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



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

## • 消息 •

## 2012 年度《世界华人消化杂志》发文情况

本刊讯 2012-01-01/2012-12-31,《世界华人消化杂志》共收到稿件1539篇,退稿887篇,退稿率57.63%,发表文章652篇,所有文章均经过编委专家同行评议。其中,发表述评34篇(5.21%),基础研究94篇(14.42%),临床研究61篇(9.36%),焦点论坛20篇(3.07%),文献综述114篇(17.48%),研究快报86篇(13.19%),临床经验222篇(34.05%),病例报告21篇(3.22%);文章作者分布遍及全国各地,绝大多数来自高等院校及附属医院。在此,特别感谢为《世界华人消化杂志》进行同行评议的各位编委专家,你们的同行评价对文章发表质量做出了重要贡献;也希望各位编委踊跃为《世界华人消化杂志》继续撰写高质量的评论性文章,为科学知识的传播做出贡献!(《世界华人消化杂志》编辑部)

# 功能性消化不良的发病机制

全甲钊, 曲波, 王蓓蓓, 白梅

全甲钊, 曲波, 王蓓蓓, 白梅, 哈尔滨医科大学附属第二医院  
消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

全甲钊, 在读硕士, 主要从事功能性胃肠疾病与幽门螺杆菌关系的研究。

哈尔滨市科委青年科技创新人才基金资助项目, No. 2018rfqys103

作者贡献分布: 本文由王蓓蓓与白梅收集整理文献; 由全甲钊完成综述; 曲波审校。

通讯作者: 曲波, 副教授, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科。

qubo\_1970@hotmail.com

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2013-01-06 修回日期: 2013-02-19

接受日期: 2013-02-20 在线出版日期: 2013-03-28

## Pathogenesis of functional dyspepsia

Jia-Zhao Tong, Bo Qu, Bei-Bei Wang, Mei Bai

Jia-Zhao Tong, Bo Qu, Bei-Bei Wang, Mei Bai, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang province, China

Supported by: the Young Talent Science and Technology Innovation Fund of Harbin Municipal Science and Technology Commission, No. 2018rfqys103

Correspondence to: Bo Qu, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Baojian Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang province, China. qubo\_1970@hotmail.com

Received: 2013-01-06 Revised: 2013-02-19

Accepted: 2013-02-20 Published online: 2013-03-28

## Abstract

Functional dyspepsia (FD) is one of the most common clinical functional gastrointestinal disorders. As a chronic, relapsing and remitting disorder, FD not only significantly affects the quality of life of patients but also causes very high medical expenses. However, the specific pathogenesis of FD has always been a big problem for gastroenterologists. Recently, motility abnormalities, visceral hypersensitivity, psychosocial factors, *Helicobacter pylori*, genetic factors, excessive gastric acid secretion, environment, diet, and lifestyle have been proposed to explain the pathogenesis of FD, of which the brain-gut axis, autonomic nervous system, gastrointestinal hormones may play an important role. In this paper, we review the recent progress in the

pathogenesis of FD.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Functional dyspepsia; Pathogenesis

Tong JZ, Qu B, Wang BB, Bai M. Pathogenesis of functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 785-790 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/785.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.785>

## 摘要

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是临床上最常见的一种功能性胃肠病, 且其具有慢性、复发性、难以缓解性, 因而不仅明显影响患者的生活质量, 而且也造成了相当高的医疗费用支出。而FD疾病具体的发病机制一直是困扰众多学者的难题。目前多数学者认为胃动力异常、内脏高敏感性、社会心理学因素、幽门螺杆菌、遗传、过度的胃酸分泌、环境、饮食及生活方式与FD的发生有关, 且脑-肠轴、自主神经系统和胃肠激素在其中可能起着重要的作用。本文旨在对近年来有关FD发病机制的研究进展做一综述, 并对其中可能存在的潜在联系做一分析。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 功能性消化不良; 发病机制

全甲钊, 曲波, 王蓓蓓, 白梅. 功能性消化不良的发病机制. *世界华人消化杂志* 2013; 21(9): 785-790 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/785.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.785>

## 0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是临床上最常见的一种功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGID), 且其具有慢性、复发性、难以缓解性<sup>[1]</sup>, 因而不仅明显的影响患者的生活质量, 而且也造成了相当高的医疗费用支出。目前, 许多致病因素被认为可能与FD有关, 包括: 胃动力异常、内脏高敏感性、社会心

## ■背景资料

功能性消化不良(FD)是临床上最常见的一种功能性胃肠病(FGID), 且其具有慢性、复发性、难以缓解性, 因而不仅明显影响患者的生活质量, 而且也造成了相当高的医疗费用支出。目前, 许多致病因素被认为可能与FD有关, 包括: 胃动力异常、内脏高敏感性、社会心理学因素、幽门螺杆菌(*H. pylori*)、遗传、环境、饮食和生活方式。其中, 胃动力异常和内脏高敏感性被认为是FD症状表现的主要因素, 其他影响因素之间也互相影响且通过调节胃动力、内脏敏感性来起作用。然而, 目前针对每种致病因素的随机对照实验研究几乎都存在较大的争议。

## ■同行评议者

陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

## ■ 研发前沿

目前认为FD与多种影响因素有关,而脑-肠轴、自主神经系统、胃肠激素可能在其中起着重要的衔接作用,目前未见有学者对其关系作一综述及分析。

理学因素、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)、遗传、环境、饮食和生活方式。其中,胃动力异常和内脏高敏感性被认为是FD症状表现的主要因素,但其他影响因素之间也互相影响且通过调节胃动力、内脏敏感性来起作用<sup>[2]</sup>。因此,理解FD疾病的各种发病机制并对其进行综合分析,从而发现其中的潜在联系,找到其中最根本、最普遍的影响因素并予以控制,或许才是解决此疾病最重要的措施。

## 1 功能性消化不良的定义及目前状况

**1.1 功能性消化不良的定义** FD是指主要表现为上腹部区域的不适症状,包括胃疼、烧心、餐后不适和胃部饱胀感等,而不能通过器质性原因来解释这些症状的消化不良,他也是众多功能性胃肠疾病(functional gastrointestinal disorders, FGID)的其中之一<sup>[2]</sup>。目前,FD的诊断主要依靠罗马III标准,他被定义为<sup>[2]</sup>起源于胃十二指肠区域的症状,而且排除可以解释这些症状的任何器质性、全身性或代谢性疾病。这些症状包括上腹痛,上腹烧灼感,餐后饱胀和早饱。诊断之前至少6 mo出现症状,近3 mo符合症状诊断标准。

**1.2 功能性消化不良疾病的目前状况** 据对一所西方大学医院门诊患者的连续性研究得出<sup>[3]</sup>,40%以腹部症状为主诉的患者被诊断为FGID。而FD作为FGID的其中之一,在西方国家的成年人中的发病率约为15%,其中约25%的患者将会寻求医疗服务<sup>[4]</sup>。在我国,消化不良患者约占普通内科门诊的10%,占消化内科门诊的50%<sup>[5]</sup>。不幸的是,尽管存在如此多的FD患者,但在严格的临床研究中,几乎没有显示出比安慰剂更为有效的治疗方法<sup>[6]</sup>。由于治疗效果的不理想,患者不断求医,且检查和治疗这种疾病的花费很大,因而使治疗FD的费效比很高<sup>[7]</sup>。因此,FD也造成了重大的社会负担。

## 2 功能性消化不良的影响因素及其发病机制

**2.1 功能性消化不良疾病的社会心理学因素** 在FD疾病的各种相关因素中,社会心理学因素获得了相对较多的关注。很早以来,临床医师就注意到有慢性胃肠道症状的患者多伴有不同程度的情绪障碍<sup>[8]</sup>。而FD疾病的异常社会心理因素被认为主要来自于不良生活应激事件、异常个性特征和应对方式。国外研究发现FD患者常具有更多的负性生活事件,而负性生活事件则

与FGID的发生和抑郁、焦虑症的发病有直接关联,而童年受虐待史是成年后FD发病的报警因素<sup>[9,10]</sup>。一项基于社区人群的巢式病例对照研究<sup>[11]</sup>也显示,心理障碍分值高、负性生活事件多者更易患FD,躯体化、人际关系敏感和生活应激事件可能是FD的独立相关因素。临床研究也显示FD患者对安慰剂的有效率比其他疾病患者高35%-40%,这很大程度上表明FD涉及心理学因素,并且催眠疗法也显示出对FD患者有效<sup>[12]</sup>。国内吴改玲等<sup>[13]</sup>也通过研究认为存在抑郁和焦虑状态的FD患者更易出现自主功能受损,从而影响胃肠道的感觉和运动。

通过以上研究可得出社会心理学因素可能在FD疾病中起着重要的作用,而胃肠症状和心理疾患的并存说明FD的潜在病理生理学机制并不能仅仅被限制在内脏,而应该涉及更高级的系统,如:脑-肠轴和自主神经系统<sup>[14]</sup>。目前认为各种环境应激因子作用于大脑的应激反应系统,通过脑-肠轴的双向调节作用于胃肠道靶器官,使胃肠道运动、感觉、分泌和免疫功能发生变化,两者相互作用、相互影响而表现为FGID<sup>[8]</sup>。脑-肠轴的互动关系<sup>[7]</sup>表现为胃肠道壁的外在性初级感觉神经元接受胃肠道刺激上传,将信息上传至中枢神经系统,整合后又将信息发至靶器官,通过内在性初级感觉神经元调节胃肠神经系统的感觉和运动;同时,感觉和动力之间也存在互动关系,伤害性刺激传入至中枢,经过整合后传出神经冲动,并抵达靶器官,引起异常的动力活动。而心理应激能够影响中枢内分泌机制和自主神经调节活动<sup>[7]</sup>。这其中,胃肠激素或许起着关键的作用,目前发现的胃肠激素有40余种,他们不仅存在于消化系统,还存在于中枢神经系统,对胃肠运动功能起着重要的调节作用,他们作为肽能神经递质,通过直接与相应受体结合发挥效应,调节其他神经递质释放和传递,且通过迷走神经介导,在中枢和外周水平上对胃运动和胃排空进行精细调节<sup>[15]</sup>。而自主神经系统作为脑-肠互动中的重要信息载体,可调控胃肠道感觉和运动,其功能状态亦颇受关注<sup>[13]</sup>,以往的多数研究<sup>[13,16-18]</sup>提示FD患者存在自主神经功能异常,而伴随抑郁和/或焦虑状态的FD患者更易出现自主神经功能受损。因此,社会心理学因素可能通过影响胃肠道的自主神经系统和直接或间接影响胃肠激素的释放来调节胃肠道的感觉和运动功能,当精神心理出现异常时导致胃动力异常、内脏高敏感性的发生,从而形



成功能性胃肠病, 包括FD。

**2.2 功能性消化不良疾病的胃酸因素** 根据报告, 质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)对未经调查的消化不良疾病具有极好的疗效<sup>[19]</sup>。Miwa等<sup>[20]</sup>和Lee等<sup>[21]</sup>通过分别向健康成人胃和十二指肠灌注PH值为1的酸溶液, 导致受试者出现各种消化不良症状, 并据此认为这种症状与胃酸紧密相关。因此, 胃酸过多也被认为是FD的一个诱发因素。

然而, 根据目前的临床资料, 对FD患者应用PPI并没有取得非常好的效果。虽然PPI被广泛应用于未经调查消化不良患者的初始治疗中<sup>[6]</sup>, 但绝大多数这些患者患有胃食管反流性疾病, 所以PPI对FD的疗效仍应当区别开来看待。此外, 胃酸分泌受多种因素的影响, 除了进食后神经因素的调节外, 还受胃泌素、组胺等胃肠激素的调节。因此, 即使胃酸与FD症状有关, 也可能不是根本因素。因为, 他的分泌同样受到自主神经系统和脑-肠轴的影响。而当FD患者存在精神心理因素异常时, 同样可能引起胃酸分泌增多, 而这也可以解释为什么对FD患者单纯应用PPI药物不能起到良好的治疗效果。

**2.3 功能性消化不良疾病的幽门螺杆菌因素** 多年来, *H. pylori*与FD之间的关系已经得到了广泛的研究, 且目前国内外的主流共识意见对*H. pylori*阳性FD明确推荐根除*H. pylori*, 然而先前的部分研究除了得出根除*H. pylori*在消除消化不良症状方面有轻微的优势外, 其余研究资料尚不足以证明*H. pylori*感染与FD之间存在因果关系<sup>[5]</sup>。并且很多严格、高质量的随机、双盲对照临床研究对于根除*H. pylori*是否有助于改善FD症状的问题仍然存在高度争议<sup>[22,23]</sup>。

一篇Meta分析<sup>[24]</sup>显示根除*H. pylori*能够明显地改善FD患者的症状, 但效果不确切: 在每15个经过治疗的患者中, 仅有1例可得到症状的完全消除。Moayyedi等<sup>[25]</sup>认为对FD患者根除*H. pylori*的效果是微小的, 且绝大多数明确诊断为FD的患者将不会得到任何益处。而最近, Mazzoleni等<sup>[26]</sup>在巴西初级医疗中进行了一个大型随机对照试验, 得出对初级医疗中的*H. pylori*阳性FD患者应用质子泵抑制剂(PPI)三联疗法比应用PPI联合安慰剂抗生素更加有效, 而且得出这种疗效能够持续到治疗后的12 mo。他们认为从初级医疗中选择研究人群更富有代表性, 因此结果比先前的研究更为可靠。我国众多学者在此方面也做了大量的研究, 除极少部分学者<sup>[27]</sup>得出*H.*

*pylori*感染与FD之间并无相关联系之外, 大多数学者<sup>[28-30]</sup>认为根除*H. pylori*可在较长时间内改善FD症状。

通过以上研究, 我们可以看到目前对于*H. pylori*与FD的关系还不明确。虽然亚洲的*H. pylori*感染临床实践指导方针<sup>[31]</sup>主张对伴有*H. pylori*感染的FD患者予以根除*H. pylori*, 我国*H. pylori*感染处理的庐山共识(2007年)<sup>[5]</sup>推荐对“有消化不良症状的慢性胃炎”患者根除*H. pylori*, 然而, 他们也意识到这种措施的有限性, 这个声明也多是考虑根除*H. pylori*对FD患者所带来的其他益处, 包括: 改善胃黏膜组织学、预防消化性溃疡、有可能降低胃癌发病率等因素。然而, *H. pylori*是否真正与FD具有相关性还值得我们深入研究。据报道*H. pylori*在全球自然人群中的感染率超过50%, 我国是*H. pylori*高感染国家, 普通人群的感染率为34.52%-80.55%, 多数地区人群感染率在50%左右, 平均感染率为58.07%<sup>[32]</sup>。而FD患者中*H. pylori*感染率为40%-70%不等<sup>[33]</sup>, 这与普通人群*H. pylori*感染率接近。由于*H. pylori*感染率在普通人群中与FD患者中波动较大, 因此不能简单地认为FD患者*H. pylori*感染率比普通人群高。

目前, 许多专家对FD疾病中的*H. pylori*因素亦提出了新的观点, Moayyedi<sup>[34]</sup>认为根除*H. pylori*或许治疗了胃镜下漏掉的消化性溃疡, 预防了随访期间消化性溃疡的发生, 且认为根除*H. pylori*减少了胃黏膜层的炎症, 导致胃动力问题的逆转, 但或许并不是*H. pylori*在其中起主要作用, 因为在*H. pylori*感染阴性患者的上消化系中也能看到炎症改变<sup>[35]</sup>。Hu等<sup>[36]</sup>通过研究得出胃部其他细菌与*H. pylori*感染的伴发率很高, 这些非*H. pylori*性细菌或许也在胃部疾病中起着一定的重要作用。Anagnostopoulos等<sup>[37]</sup>亦对目前FD疾病的诊断及治疗提出质疑, 对*H. pylori*感染引起的消化不良, 他们认为这是由于*H. pylori*感染引起的器质性病变所引起, 且这种病变能够通过内镜, 尤其是放大内镜所观察到。他们还认为在某些器质性消化不良患者中, 患者的持续症状或许与FD症状具有重叠, 这样才能更好的解释那些治疗“器质性疾病”后仍然消化不良的情况<sup>[38]</sup>。

然而, 由于目前FD的病理生理学机制复杂多样, 而*H. pylori*在普通人群中的感染率本身就很高, 很多*H. pylori*阳性个体并没有FD症状, 且精神心理因素也能够通过脑肠轴影响胃肠激素

#### ■ 相关报道

柯美云认为脑-肠轴的互动关系表现为胃肠道壁的外在性初级感觉神经元接受胃肠道刺激上传, 将信息上传至中枢神经系统, 整合后又将信息发至靶器官, 通过内在性初级感觉神经元调节胃肠神经系统的感觉和运动。同时, 感觉和动力之间也存在互动关系, 伤害性刺激传入至中枢神经系统, 经过整合后传出神经冲动, 并抵达靶器官, 引起异常的动力活动。且心理应激能够影响中枢内分泌机制和自主神经调节活动。

### ■应用要点

本文对目前FD的各种发病机制做一综述,并对其之间可能的相互联系做一分析,为今后FD疾病病理生理学机制的研究提供参考。

的分泌,可能继而影响到胃的免疫及自我防护功能,从而导致*H. pylori*感染程度加重,引起一系列消化不良症状。且目前未见有人对*H. pylori*阳性FD患者中*H. pylori*的感染程度进行研究,因此单纯*H. pylori*感染与FD的确切关系还需要进一步的研究。

**2.4 功能性消化不良疾病中的遗传因素** 遗传因素方面, Holtmann等<sup>[39]</sup>发现消化不良症状与G-蛋白 $\beta 3$ 亚族基因825位置的单核苷酸多态性基因型有关,这一发现也激发了很多在FD领域遗传学的研究<sup>[40-42]</sup>,并得出FD与遗传的关系可能随民族和地理区域的不同而改变<sup>[2]</sup>,而直接的证据是美国的一项研究结果显示,一级亲属有腹部疼痛或肠道问题与本人患肠易激综合征(OR: 2.3; 95% CI: 1.3-3.9)或FD(OR: 1.8; 95% CI: 1.05-3.0)有相关性<sup>[43]</sup>。Gathaiya等<sup>[44]</sup>对从社区中随机选取的消化不良患者进行潜在危险因素评估,并得出具有胃肠疾病家族史的患者更可能报告具有消化不良症状。

基因的差异同样是通过影响神经调节递质信号及胃肠激素、炎症介质来影响个人的胃肠感觉、运动、免疫及自我防护机制来实现的<sup>[45]</sup>,这也说明了具有FD易感基因的个体容易受外界因素干扰,而罹患FD疾病。

**2.5 功能性消化不良疾病中的环境、饮食及生活方式因素** 目前,有报道称在童年时期遭受过身体或者性虐待的FD患者比其他FD患者具有更高的胃敏感性,并且成年后的受虐待史也与胃的容积改变具有相关性<sup>[46]</sup>。而这些不良环境及不良事件的影响必然影响个人的社会心理学因素,这可能仍然是通过异常的精神心理因素而引起FD症状。

饮食很有可能影响FD症状的表现,但是很多研究强调这样的影响很小,并且也有争议。饮食因素包括摄入的营养物类型和对某些食物或者营养素的潜在偏见和认知因素<sup>[47]</sup>。FD症状常常与食物的摄取有关,因此FD与食物的关系得到较多的关注。目前,有报道摄取脂肪或许会加重消化不良症状,并且腹部饱胀感与脂肪摄取和摄取的食物量有关<sup>[48,49]</sup>。另一项研究显示摄入高蛋白、高热量食物后,谷氨酸能够促进胃的运动<sup>[50]</sup>。然而,流行病学研究却显示在饮食和消化不良症状之间没有发现明显的相关性<sup>[44,51]</sup>。因此,饮食与FD之间的关系还需要进一步的研究。

目前认为生活方式包括低下的社会经济地位、吸烟、过多的摄入咖啡因、贫穷的生活

环境和慢性疾病能够引起或加重消化不良症状<sup>[52,53]</sup>。而这些因素明显能够影响个体的心理方面,因此不良生活方式引起FD的具体病理生理学机制还有待研究。而不良饮食习惯,包括空腹、不规律进食、暴饮暴食、食用刺激性食物与FD症状的相关性已经得到了我国多数学者的认可,但是目前国内外还缺乏对此方面的科学性研究。

不管是不良的生活环境还是不良的生活方式,他们在作用的同时必然伴随着对大脑中枢及胃肠道自主神经系统的刺激,从而影响胃肠激素的分泌,引起胃动力异常和内脏高敏感性,导致FD疾病的发生。

### 3 结论

各种影响因素都可能影响脑-肠轴和自主神经系统,从而引起胃肠激素和自主神经系统的改变,继而形成胃动力异常和内脏高敏感性,引发FD症状。而社会心理学因素、*H. pylori*因素、遗传因素和不良生活习惯因素或许是FD疾病的独立危险因素,这些因素可以独立存在,又可能通过相互影响、相互促进来引发或者加重FD症状,从而造成了FD病理生理学机制的复杂性。但这些危险因素影响脑-肠轴以及自主神经系统的机制和胃动力异常、内脏高敏感性的确切形成机制目前尚不清楚,且目前对这些独立危险因素与FD关系的研究普遍存在较多的争议,这也是需要我们去进一步研究的方向。而以往对这些独立危险因素进行实验研究时<sup>[22,23,48,49]</sup>,多没有把其他影响因素考虑在内,这无疑会造成研究结果的不准确性,导致实验结果的不完全一致,从而形成较大的争议。因此,我们在以后对某种独立危险因素进行研究的设计中,必须把其他可能的影响因素考虑在内,进行必要的排除,从而形成相对的单因素分析,只有这样,我们或许才能得到良好一致的结果,才能更接近问题的本质。

### 4 参考文献

- 1 Ford AC. Eradicating *Helicobacter pylori* in functional dyspepsia. *Gastroenterology* 2012; 142: 1613-1614 [PMID: 22537648]
- 2 Miwa H, Watari J, Fukui H, Oshima T, Tomita T, Sakurai J, Kondo T, Matsumoto T. Current understanding of pathogenesis of functional dyspepsia. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 3: 53-60 [PMID: 21443711 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06633.x]
- 3 Okumura T, Tanno S, Ohhira M, Tanno S. Prevalence of functional dyspepsia in an outpatient clinic

- with primary care physicians in Japan. *J Gastroenterol* 2010; 45: 187-194 [PMID: 19997854 DOI: 10.1007/s00535-009-0168-x]
- 4 Thompson WG, Heaton KW. Functional bowel disorders in apparently healthy people. *Gastroenterology* 1980; 79: 283-288 [PMID: 7399231]
  - 5 刘文忠. 幽门螺杆菌感染与非溃疡性消化不良. 现代消化及介入诊疗 2010; 15: 91-97
  - 6 Talley NJ, Vakil N. Guidelines for the management of dyspepsia. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2324-2337 [PMID: 16181387 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.00225.x]
  - 7 柯美云. 功能性胃肠病并非单纯性功能病. 中国实用内科杂志 2006; 26: 721-722
  - 8 梁列新. 功能性消化不良的心理社会因素研究. 胃肠病学 2008; 13: 125-128
  - 9 Miranda A. Early life stress and pain: an important link to functional bowel disorders. *Pediatr Ann* 2009; 38: 279-282 [PMID: 19476301]
  - 10 Sherbourne CD, Edelen MO, Zhou A, Bird C, Duan N, Wells KB. How a therapy-based quality improvement intervention for depression affected life events and psychological well-being over time: a 9-year longitudinal analysis. *Med Care* 2008; 46: 78-84 [PMID: 18162859]
  - 11 Locke GR, Weaver AL, Melton LJ, Talley NJ. Psychosocial factors are linked to functional gastrointestinal disorders: a population based nested case-control study. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 350-357 [PMID: 15046228 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2004.04043.x]
  - 12 Miller V, Whorwell PJ. Hypnotherapy for functional gastrointestinal disorders: a review. *Int J Clin Exp Hypn* 2009; 57: 279-292 [PMID: 19459089 DOI: 10.1080/00207140902881098]
  - 13 吴改玲, 蓝宇. 符合罗马Ⅲ标准FD患者心理测试及自主神经功能观察44例. 世界华人消化杂志 2012; 20: 1473-1477
  - 14 Wu JC. Community-based study on psychological comorbidity in functional gastrointestinal disorder. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 3: 23-26 [PMID: 21443703 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.06642.x]
  - 15 Mosiienko HP. [Role of gastrointestinal hormones in pathogenesis of functional diseases of the digestive system in adolescent]. *Lik Sprava* 2008; (7-8): 47-50 [PMID: 19663016]
  - 16 Troncon LE, Thompson DG, Ahluwalia NK, Barlow J, Heggie L. Relations between upper abdominal symptoms and gastric distension abnormalities in dysmotility like functional dyspepsia and after vagotomy. *Gut* 1995; 37: 17-22 [PMID: 7672673 DOI: 10.1136/gut.37.1.17]
  - 17 黄纯焜, 李翀, 王春琳, 王林海, 王晓栋, 刘静, 杨琳. 功能性消化不良与心理因素及自主神经功能关系的初步研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002; 11: 346-348
  - 18 李迎春, 赵宝龙, 周红, 王军, 王萍, 王井红. 心理状态变化与自主神经功能改变及胃电节律紊乱在功能性消化不良中的相互关系. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2063-2066
  - 19 Veldhuyzen van Zanten SJ, Chiba N, Armstrong D, Barkun A, Thomson A, Smyth S, Escobedo S, Lee J, Sinclair P. A randomized trial comparing omeprazole, ranitidine, cisapride, or placebo in helicobacter pylori negative, primary care patients with dyspepsia: the CADET-HN Study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1477-1488 [PMID: 15984968 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.40280.x]
  - 20 Miwa H, Nakajima K, Yamaguchi K, Fujimoto K, Veldhuyzen VAN Zanten SJ, Kinoshita Y, Adachi K, Kusunoki H, Haruma K. Generation of dyspeptic symptoms by direct acid infusion into the stomach of healthy Japanese subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 257-264 [PMID: 17593071 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2007.03367.x]
  - 21 Lee KJ, Vos R, Janssens J, Tack J. Influence of duodenal acidification on the sensorimotor function of the proximal stomach in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G278-G284 [PMID: 12760903 DOI: 10.1152/ajpgi.00086.2003]
  - 22 McColl K, Murray L, El-Omar E, Dickson A, El-Nujumi A, Wirz A, Kelman A, Penny C, Knill-Jones R, Hilditch T. Symptomatic benefit from eradicating *Helicobacter pylori* infection in patients with nonulcer dyspepsia. *N Engl J Med* 1998; 339: 1869-1874 [PMID: 9862941 DOI: 10.1056/NEJM199812243392601]
  - 23 Blum AL, Talley NJ, O'Moráin C, van Zanten SV, Labenz J, Stolte M, Louw JA, Stubberöd A, Theodórs A, Sundin M, Bolling-Sternevald E, Jung-Hard O. Lack of effect of treating *Helicobacter pylori* infection in patients with nonulcer dyspepsia. Omeprazole plus Clarithromycin and Amoxicillin Effect One Year after Treatment (OCAY) Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 1875-1881 [PMID: 9862942 DOI: 10.1056/NEJM199812243392602]
  - 24 Laine L, Schoenfeld P, Fennerty MB. Therapy for *Helicobacter pylori* in patients with nonulcer dyspepsia. A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med* 2001; 134: 361-369 [PMID: 11242496]
  - 25 Moayyedi P, Deeks J, Talley NJ, Delaney B, Forman D. An update of the Cochrane systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy in nonulcer dyspepsia: resolving the discrepancy between systematic reviews. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2621-2626 [PMID: 14687807 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2003.08724.x]
  - 26 Mazzoleni LE, Sander GB, Francesconi CF, Mazzoleni F, Uchoa DM, De Bona LR, Milbradt TC, Von Reisswitz PS, Berwanger O, Bressel M, Edelweiss MI, Marini SS, Molina CG, Folador L, Lunkes RP, Heck R, Birkhan OA, Spindler BM, Katz N, Colombo Bda S, Guerrieri PP, Renck LB, Grando E, Hocevar de Moura B, Dahmer FD, Rauber J, Prolla JC. *Helicobacter pylori* eradication in functional dyspepsia: HEROES trial. *Arch Intern Med* 2011; 171: 1929-1936 [PMID: 22123802 DOI: 10.1001/archinternmed.2011.533]
  - 27 李尚勤, 孟丽秋. 功能性消化不良与幽门螺杆菌感染的相关性研究. 医学综述 2005; 11: 952-953
  - 28 卢世建. 根除幽门螺杆菌治疗功能性消化不良. 临床医学 2008; 28: 79-80
  - 29 沈洲立, 陈秀英. 联合根除幽门螺杆菌治疗功能性消化不良362例的临床分析. 重庆医学 2009; 38: 1779-1780
  - 30 李爱平. 根除幽门螺杆菌在以罗马Ⅲ为诊断标准的功能性消化不良中的作用. 中国中医药咨讯 2010; 2: 18-19, 27
  - 31 Fock KM, Katelaris P, Sugano K, Ang TL, Hunt R, Talley NJ, Lam SK, Xiao SD, Tan HJ, Wu CY, Jung HC, Hoang BH, Kachintorn U, Goh KL, Chiba T, Rani AA. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1587-1600 [PMID: 19788600 DOI:

# 同行评价

本文具有一定的可读性、科学性。



- 10.1111/j.1440-1746.2009.05982.x]
- 32 张天哲, 张铁民, 赵丹丹, 唐桂钰. 中国人群幽门螺杆菌感染相关因素的Meta分析. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1582-1589
  - 33 彭娜, 徐三平. 根治幽门螺杆菌在功能性消化不良治疗中的意义. 临床消化病杂志 2008; 20: 81-82, 89
  - 34 Moayyedi P. Helicobacter pylori eradication for functional dyspepsia: what are we treating?: comment on "Helicobacter pylori eradication in functional dyspepsia". *Arch Intern Med* 2011; 171: 1936-1937 [PMID: 22123803 DOI: 10.1001/archinternmed.2011.541]
  - 35 Futagami S, Shindo T, Kawagoe T, Horie A, Shim-puku M, Gudis K, Iwakiri K, Itoh T, Sakamoto C. Migration of eosinophils and CCR2-/CD68-double positive cells into the duodenal mucosa of patients with postinfectious functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 1835-1842 [PMID: 20461070 DOI: 10.1038/ajg.2010.151]
  - 36 Hu Y, He LH, Xiao D, Liu GD, Gu YX, Tao XX, Zhang JZ. Bacterial flora concurrent with Helicobacter pylori in the stomach of patients with upper gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 1257-1261 [PMID: 22468090 DOI: 10.3748/wjg.v18.i11.1257]
  - 37 Anagnostopoulos GK, Yao K, Kaye P, Fogden E, Fortun P, Shonde A, Foley S, Sunil S, Atherton JJ, Hawkey C, Ragnunath K. High-resolution magnification endoscopy can reliably identify normal gastric mucosa, Helicobacter pylori-associated gastritis, and gastric atrophy. *Endoscopy* 2007; 39: 202-207 [PMID: 17273960]
  - 38 Osawa H, Kita H, Ohnishi H, Nakazato M, Date Y, Bowlus CL, Ishino Y, Watanabe E, Shiya T, Ueno H, Hoshino H, Satoh K, Sugano K. Changes in plasma ghrelin levels, gastric ghrelin production, and body weight after Helicobacter pylori cure. *J Gastroenterol* 2006; 41: 954-961 [PMID: 17096064]
  - 39 Holtmann G, Siffert W, Haag S, Mueller N, Langkafel M, Senf W, Zotz R, Talley NJ. G-protein beta 3 subunit 825 CC genotype is associated with unexplained (functional) dyspepsia. *Gastroenterology* 2004; 126: 971-979 [PMID: 15057736 DOI: 10.1053/j.gastro.2004.01.006]
  - 40 Camilleri CE, Carlson PJ, Camilleri M, Castillo EJ, Locke GR, Geno DM, Stephens DA, Zinsmeister AR, Urrutia R. A study of candidate genotypes associated with dyspepsia in a U.S. community. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 581-592 [PMID: 16464220 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2006.00481.x]
  - 41 Oshima T, Nakajima S, Yokoyama T, Toyoshima F, Sakurai J, Tanaka J, Tomita T, Kim Y, Hori K, Matsumoto T, Miwa H. The G-protein beta3 subunit 825 TT genotype is associated with epigastric pain syndrome-like dyspepsia. *BMC Med Genet* 2010; 11: 13 [PMID: 20102604 DOI: 10.1186/1471-2350-11-13]
  - 42 Tahara T, Arisawa T, Shibata T, Wang F, Nakamura M, Sakata M, Hirata I, Nakano H. Homozygous 825T allele of the GNB3 protein influences the susceptibility of Japanese to dyspepsia. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 642-646 [PMID: 17717746 DOI: 10.1007/s10620-007-9923-0]
  - 43 Locke GR, Zinsmeister AR, Talley NJ, Fett SL, Melton LJ. Familial association in adults with functional gastrointestinal disorders. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 907-912 [PMID: 10994826]
  - 44 Gathaiya N, Locke GR, Camilleri M, Schleck CD, Zinsmeister AR, Talley NJ. Novel associations with dyspepsia: a community-based study of familial aggregation, sleep dysfunction and somatization. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 922-e69 [PMID: 19496951 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2009.01320.x]
  - 45 季洁如, 陈胜良. 功能性胃肠病的遗传机制-相关基因研究. 国际消化病杂志 2008; 28: 377-379
  - 46 Geeraerts B, Van Oudenhove L, Fischler B, Vandenberghe J, Caenepeel P, Janssens J, Tack J. Influence of abuse history on gastric sensorimotor function in functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil* 2009; 21: 33-41 [PMID: 18694440 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2008.01178.x]
  - 47 Feinle-Bisset C, Horowitz M. Dietary factors in functional dyspepsia. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 608-618 [PMID: 16918725 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2006.00790.x]
  - 48 Pilichiewicz AN, Horowitz M, Holtmann GJ, Talley NJ, Feinle-Bisset C. Relationship between symptoms and dietary patterns in patients with functional dyspepsia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7: 317-322 [PMID: 18929687]
  - 49 Pilichiewicz AN, Feltrin KL, Horowitz M, Holtmann G, Wishart JM, Jones KL, Talley NJ, Feinle-Bisset C. Functional dyspepsia is associated with a greater symptomatic response to fat but not carbohydrate, increased fasting and postprandial CCK, and diminished PYY. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2613-2623 [PMID: 18775003 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2008.02041.x]
  - 50 Kusano M, Zai H, Hosaka H, Shimoyama Y, Nagoshi A, Maeda M, Kawamura O, Mori M. New frontiers in gut nutrient sensor research: monosodium L-glutamate added to a high-energy, high-protein liquid diet promotes gastric emptying: a possible therapy for patients with functional dyspepsia. *J Pharmacol Sci* 2010; 112: 33-36 [PMID: 20093786 DOI: 10.1254/jphs.09R08FM]
  - 51 Saito YA, Locke GR, Weaver AL, Zinsmeister AR, Talley NJ. Diet and functional gastrointestinal disorders: a population-based case-control study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2743-2748 [PMID: 16393229 DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.00288.x]
  - 52 Mahadeva S, Goh KL. Epidemiology of functional dyspepsia: a global perspective. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2661-2666 [PMID: 16718749]
  - 53 Mahadeva S, Yadav H, Rampal S, Goh KL. Risk factors associated with dyspepsia in a rural Asian population and its impact on quality of life. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 904-912 [PMID: 20179699 DOI: 10.1038/ajg.2010.26]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



# 管腔内局部照射诱发急性放射性食管损伤动物模型的构建及其应用

全甲钊, 曲波, 王耀明, 金世柱, 崔亚利, 辛然, 王蓓蓓, 姜海燕

全甲钊, 曲波, 金世柱, 王蓓蓓, 姜海燕, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
王耀明, 黑龙江省医院放射科 黑龙江省哈尔滨市 150036  
崔亚利, 哈尔滨医科大学附属第三医院放射科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
辛然, 哈尔滨医科大学附属第二医院重症医学科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
全甲钊, 在读硕士, 主要从事骨髓间充质干细胞移植治疗食管放射性损伤的研究。  
哈尔滨市科委青年科技创新人才基金资助项目, No. 2018rfqys103  
作者贡献分布: 此课题由曲波与金世柱设计; 研究过程由全甲钊、辛然、王蓓蓓及姜海燕操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王耀明与崔亚利提供; 数据分析由王耀明与崔亚利完成; 本文写作由全甲钊完成。  
通讯作者: 曲波, 副教授, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科。  
qubo\_1970@hotmail.com  
电话: 0451-86605143  
收稿日期: 2013-01-24 修回日期: 2013-02-15  
接受日期: 2013-02-20 在线出版日期: 2013-03-28

## Development of a rat model of intraluminal local radiation-induced acute radioactive esophageal injury

Jia-Zhao Tong, Bo Qu, Yao-Ming Wang, Shi-Zhu Jin, Ya-Li Cui, Ran Xin, Bei-Bei Wang, Hai-Yan Jiang

Jia-Zhao Tong, Bo Qu, Shi-Zhu Jin, Bei-Bei Wang, Hai-Yan Jiang, Department of Gastroenterology and Hepatology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Yao-Ming Wang, Department of Radiology, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin 150036, Heilongjiang Province, China  
Ya-Li Cui, Department of Radiology, the Third Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Ran Xin, Department of ICU, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Supported by: the Young Talent Science and Technology Innovation Fund of Harbin Municipal Science and Technology Commission, No. 2018rfqys103  
Correspondence to: Bo Qu, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Baojian Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. qubo\_1970@hotmail.com  
Received: 2013-01-24 Revised: 2013-02-15  
Accepted: 2013-02-20 Published online: 2013-03-28

## Abstract

**AIM:** To develop a rat model of acute radioactive esophageal injury by local irradiation of the esophagus with  $^{125}\text{I}$  seed chain and to explore its clinical application.

**METHODS:**  $^{125}\text{I}$  seed chain was used to locally irradiate the esophagus of SD rats. The rats were killed on days 3, 5 and 7 after irradiation to take the full-length esophageal tissue. Tissue samples were embedded in paraffin, sectioned, and subjected to HE staining for pathological analysis. Pathological changes in the full-length esophageal tissue at one week and two weeks and living status at two weeks after intraluminal irradiation with 0.8 mCi  $^{125}\text{I}$  seed chain (initial activity 0.8 mCi) were observed.

**RESULTS:** The chain of five  $^{125}\text{I}$  seeds, with an initial activity of  $> 0.6$  mCi, could induce radioactive esophageal injury by intraluminally irradiating the esophagus for 5 d. Radioactive esophageal injury increased gradually with the increase in particle activity.  $^{125}\text{I}$  seed chain could be easily taken out postoperatively to avoid further esophageal injury. SD rats could gradually resume eating after intraluminal irradiation with  $^{125}\text{I}$  seed chain, and the injury tended to be repaired in two weeks.

**CONCLUSION:** The chain of five  $^{125}\text{I}$  seeds, with an initial activity of  $> 0.6$  mCi, can induce radioactive esophageal injury by intraluminally irradiating the rat esophagus for five days. Intraluminal brachytherapy with low-energy radionuclide  $^{125}\text{I}$  seed chain may provide a clinical option for treatment of advanced esophageal cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Radioactive esophageal injury;  $^{125}\text{I}$  seeds; Advanced esophageal carcinoma; Brachytherapy; Animal model

Tong JZ, Qu B, Wang YM, Jin SZ, Cui YL, Xin R, Wang

## ■背景资料

长期以来, 食管放射性损伤是头、颈及胸部恶性肿瘤放射治疗的重要并发症之一。它能够引起患者胸骨后疼痛、烧灼感、吞咽不适, 严重时甚至出现呛咳、呼吸困难、呕吐、咯血等, 严重影响患者的生存质量, 而且限制了放疗的剂量和进程。过去对食管放射性损伤的治疗主要集中在止痛解痉、抗菌消炎、保护消化道黏膜的对症处理上, 然而这些并不能从根本上解决问题。近些年来, 干细胞移植治疗组织器官损伤逐渐成为研究的热点, 且既往研究显示, 通过静脉注射骨髓细胞对接受单粒级高剂量照射的食管能够起到保护作用, 而干细胞移植治疗食管放射性损伤的研究需要较精确的动物模型。

## ■同行评议者

官泳松, 教授, 四川大学华西医院放射科

## ■ 研发前沿

以往的造模方法主要为外照射,照射剂量率大,短时间内使照射野接受非常大的射线剂量,虽然在照射过程中用铅板遮蔽了除照射野外的其他部分,但照射范围仍不够精确,且对照射野深度无法把握,不可避免地对食管周围组织同样造成较大的损伤。采用低能核素进行食管腔内照射的动物模型未见相关研究。

BB, Jiang HY. Development of a rat model of intraluminal local radiation-induced acute radioactive esophageal injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 791-797 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/791.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.791>

## 摘要

**目的:** 构建急性放射性食管损伤动物模型,并进行临床应用方法学探讨。

**方法:** 应用不同初始活度的 $^{125}\text{I}$ 粒子链于SD大鼠食管管腔内进行局部照射,分别于照射3、5、7 d后处死大鼠,取全长食管组织做石蜡包埋、切片、HE染色,与空白组对照,进行病理学分析。观察初始活度0.8 mCi  $^{125}\text{I}$ 粒子链食管腔内照射后2 wk内大鼠生存状况及其7 d组在1 wk、2 wk时大鼠全长食管组织的病理变化。

**结果:** 初始活度在0.6 mCi以上的5颗 $^{125}\text{I}$ 粒子组成的粒子链对SD大鼠行食管腔内局部照射5 d以上可诱发放射性食管损伤,随粒子活度的增加,放射性食管损伤逐渐加重。术后, $^{125}\text{I}$ 粒子链可方便取出,不会对大鼠食管进一步损伤,且经 $^{125}\text{I}$ 粒子链食管腔内照射后SD大鼠可逐渐恢复饮食,2 wk后大鼠食管放射性损伤有修复的趋势。

**结论:** 食管管腔内应用初始活度0.6 mCi以上的5颗 $^{125}\text{I}$ 粒子组成的粒子链接近零距离持续照射5 d以上能够引起放射性食管损伤。食管腔内应用低能核素 $^{125}\text{I}$ 粒子链近距离放疗或许可为临床姑息治疗晚期食管癌提供方法学借鉴。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 放射性食管损伤;  $^{125}\text{I}$ 粒子; 晚期食管癌; 近距离放射疗法; 动物模型

全甲钊, 曲波, 王耀明, 金世柱, 崔亚利, 辛然, 王蓓蓓, 姜海燕. 食管腔内局部照射诱发急性放射性食管损伤动物模型的构建及其应用. *世界华人消化杂志* 2013; 21(9): 791-797 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/791.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.791>

## 0 引言

长期以来,食管放射性损伤是头、颈及胸部恶性肿瘤放射治疗的重要并发症之一。它能够引起患者胸骨后疼痛、烧灼感、吞咽不适,严重时甚至出现呛咳、呼吸困难、呕吐、呕血等,严重影响患者的生存质量,而且限制了放疗的剂量和进程<sup>[1]</sup>。过去对食管放射性损伤的治疗主要集中在止痛解痉、抗菌消炎、保护消化系黏

膜的对症处理上,然而这些并不能从根本上解决问题。近些年来,干细胞移植治疗组织器官损伤逐渐成为研究的热点<sup>[2]</sup>,且既往研究显示<sup>[3]</sup>,通过静脉注射骨髓细胞对接受单粒级高剂量照射的食管能够起到保护作用。干细胞主要通过向损伤组织处特异性归巢、分化来达到修复损伤组织的目的,因此干细胞移植治疗食管放射性损伤的研究需要较精确的动物模型。以往的放射性食管损伤动物模型主要通过外照射<sup>[4,5]</sup>,虽然采用铅板遮蔽大部分照射野,但仍然无法保证照射的精确性。因此,目前急需建立一种简单易行,造模精确的动物模型,且可以大样本的制作,从而为预防、治疗放射性食管损伤研究提供一种可行的造模方法。本研究通过使用 $^{125}\text{I}$ 粒子链对清洁级SD大鼠进行食管腔内持续局部照射,后进行放射线学检查定位及组织病理学检查,成功建立急性放射性食管损伤的动物模型。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年♂清洁级SD大鼠84只,体重280-300 g,由哈尔滨医科大学第二附属医院实验动物研究中心提供。动物生长环境温度 $23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,湿度75%。随机分为3个实验组,根据粒子初始活度的不同,分别为0.4 mCi组(18只)、0.6 mCi组(18只)、0.8 mCi组(18只),每个实验组按照照射时间3、5、7 d再分为3个亚组,共9组,每组各6只SD大鼠;另取24只SD大鼠,为观察组,分为A、B两组,其中A组18只,分组及处理同0.8 mCi组,于照射后2 wk时处死。B组6只,处理同0.8 mCi组7 d组,于照射后1 wk时处死;另设空白对照组6只。容纳 $^{125}\text{I}$ 粒子的细管(一次性输尿管导管,由上海上医康鸽医用器材有限责任公司生产,生产批号101103,规格F4), $^{125}\text{I}$ 粒子(6711型,呈圆柱状,长4.8 mm,直径0.8 mm,半衰期为59.6 d,能量为27.4-31.5 MeV X射线及35.5 MeV  $\gamma$ 射线,初始剂量率7.7 cGy/h,由天津赛德生物制药有限公司生产);7号缝合线;放射性防护设备:铅衣、铅眼镜、铅围脖、铅手套等;缝合针;直径0.7 mm导丝;X光机(荷兰PHILIPS公司);病理切片机(LEICA SM2000R,产自德国);显微镜(中国Motic公司),放大率100-400倍之间;HE染液;10%水合氯醛;利多卡因;医用碘伏皮肤消毒液。

## 1.2 方法

**1.2.1  $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置剂量学:** 本实验放射源由5颗 $^{125}\text{I}$ 粒子沿粒子长轴方向无间隔紧密直线排



列而成, 因此采用王耀明等<sup>[6]</sup>  $^{125}\text{I}$ 粒子链管内近距离治疗剂量学公式:  $D(r, \theta) = \sum_{i=1}^N D(r_i, \theta_i)$ , 其中,  $(r, \theta)$ 为关心点处的剂量率(单位:  $\text{cGy/h}$ ),  $N$ 为粒子数目,  $r_i$ 为关心点与各个粒子中心的距离,  $\theta_i$ 为关心点和粒子中心的连线与源长轴方向的夹角。

**1.2.2  $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置的放置与组织处理:** 所有大鼠均用10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)行腹腔注射麻醉后仰卧固定于鼠板上。实验组每个 $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置放置5颗预置的 $^{125}\text{I}$ 粒子, 分别为0.4、0.6、0.8 mCi, 对照组不放置 $^{125}\text{I}$ 粒子。实验前, 对 $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置、缝合线、缝针和SD大鼠口腔壁用碘伏进行消毒。待固定好大鼠后, 用导丝分别把对应的 $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置通过大鼠口腔送入每只大鼠的食管内, 送入深度选择为8 cm(此处可尽量减少对肺部敏感组织的照射), 后拔出导丝, 连接照射装置上的缝线于缝合针, 用利多卡因对大鼠尽量靠近咽部的口腔壁行局部麻醉后, 缝于大鼠口腔壁上从而固定 $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置。操作完毕, 分别通过X线拍摄定位, 确定 $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置位于大鼠食管内。大鼠复苏后, 给予进流食。在对应照射时间后, 用10%水合氯醛行腹腔注射麻醉大鼠, 经X线检查确定 $^{125}\text{I}$ 粒子链位置, 后取出 $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置, 同时处死实验组大鼠, 取全长食管组织, 用4%多聚甲醛溶液固定, 经脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋处理后切片, HE染色后于显微镜下观察食管组织病理变化, 并处理保存图像。照射后观察组实验方法同上, 而在取出 $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置后, 不予处死, 给予3 d组、5 d组、7 d组B组大鼠正常进食, 每天观察记录大鼠照射后2 wk内生存状态并记录大鼠进食、饮水情况。其中7 d组大鼠在照射后2 wk时处死, 取全长食管组织, 进行组织病理学分析。照射后观察组7 d组A组在照射后1 wk时处死, 并取全长食管组织, 进行组织病理学分析。

**1.2.3 病理对照评分:** 根据组织损伤程度<sup>[7]</sup>分为: 0: 黏膜层, 黏膜下层, 肌层及外膜层均无病理损伤; +: 黏膜上皮轻度坏死脱落(鳞状上皮层、棘细胞层破坏脱落, 基底层轻微破坏, 基底细胞间有微小裂隙, 基底层细胞中出现灶状核周空泡); ++: 黏膜上皮中度破坏(鳞状上皮层、棘细胞层、基底细胞层部分坏死脱落, 脱落范围小); +++: 黏膜上皮重度破坏, 全层剥脱, 脱落范围大。根据炎细胞浸润深度及程度<sup>[7]</sup>分为: 0: 黏膜层, 黏膜下层, 肌层及外膜层均无炎细胞浸润; +: 固有层或黏膜下层有少量炎细胞(1-5 neutrophil/HP), 炎细胞未侵及肌层和外膜层; ++: 固有层

和黏膜下层均存在中量炎细胞(6-15 neutrophil/HP), 少量炎细胞侵及肌层或外膜层; +++: 大量炎细胞(>15 neutrophil/HP)浸润固有层、黏膜下层、肌层和外膜。每1个“+”算作1分。放射性食管炎病理阴性积分为0。放射性食管炎病理变化程度为组织损伤及炎细胞浸润积分之和。

**统计学处理** 所有数据采用SAS9.1软件进行统计学分析处理, 各组放射性食管炎病理积分值的比较用One Way ANOV分析, 结果以mean  $\pm$  SD表示, 独立样本均数之间比较采用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1  $^{125}\text{I}$ 粒子链置入大鼠食管腔结果**  $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置通过大鼠口腔顺利置入食管腔预置位置, 拍摄X线定位可见 $^{125}\text{I}$ 粒子链整齐排列于食管腔内(图1), 口端缝线缝于口腔壁后2 wk时间内未见皮肤感染。

**2.2 食管及周围组织吸收剂量** 根据王耀明等<sup>[6]</sup>的计算结果: 由于粒子的标量叠加作用, 10枚与20枚初始活度1 mCi的 $^{125}\text{I}$ 粒子组成的粒子链在距中心点以及端点垂直距离为0.5 cm处的剂量率( $\text{cGy/h}$ , 1 Gy = 100 cGy)分别为13.7178 cGy/h、14.0896 cGy/h和7.0448 cGy/h、7.0703 cGy/h。从结果中可见, 当粒子数目较多时, 由于关心点和粒子中心的连线与源长轴方向的夹角很小, 所以粒子链剂量率与粒子数目关系较小。而我们的实验模型, 大鼠食管壁几乎紧贴输尿管导管, 食管壁距种子源的最近距离接近0.5 mm。因此, 粒子周围食管组织接受到的放射剂量率将更高, 假设粒子活度为1 mCi, 粒子链周围食管组织接受到的放射剂量率范围理论上可高于7-13 cGy/h。

**2.3 对照组正常食管组织HE染色表现** 大鼠正常食管管腔内侧有一层薄的角化层, 黏膜层细胞排列紧密, 基底层细胞核染色较深, 向上皮侧蓝色逐渐变浅, 显示细胞分化良好。固有层有稀疏的胶原纤维, 多为纤维母细胞。肌层分为内环肌和外纵肌。外膜层较薄, 各层食管组织未见炎细胞浸润(图2A)。

**2.4 实验组食管组织肉眼、病理表现** 0.4 mCi组: 3、5、7 d组大鼠食管黏膜均未发生明显食管炎病理改变, 可于5 d和7 d组发现角化层增厚, 基底层细胞增生, 多边细胞层增厚, 少数血管轻度充血(图2B)。

0.6 mCi组: 3 d组肉眼均未见明显改变, 经HE染色后, 显微镜下观察可发现角化层增厚, 基

## ■ 相关报道

目前, 新型低能核素 $^{125}\text{I}$ 粒子由于其低能、安全性强等优点已被广泛应用于腔内近距离放射、食管支架联合 $^{125}\text{I}$ 粒子和肿瘤内植入 $^{125}\text{I}$ 粒子治疗食管癌的研究。

### ■应用要点

本研究可为建立放射性食管损伤动物模型提供一种新的造模方法,且为应用于临床治疗晚期食管癌提供方法学借鉴。

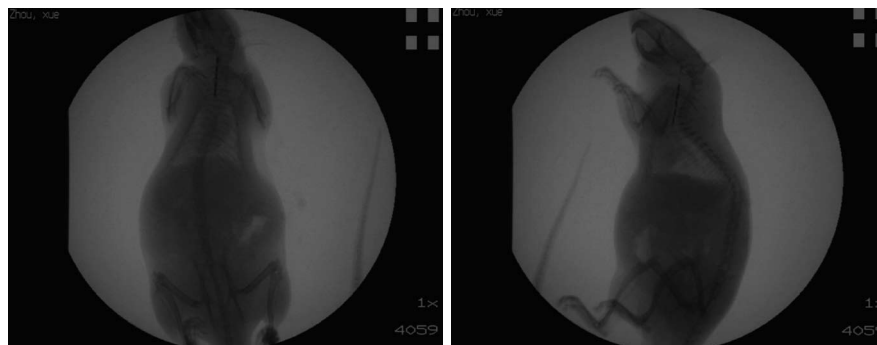


图1 动物模型<sup>125</sup>I粒子链照射装置X线定位。

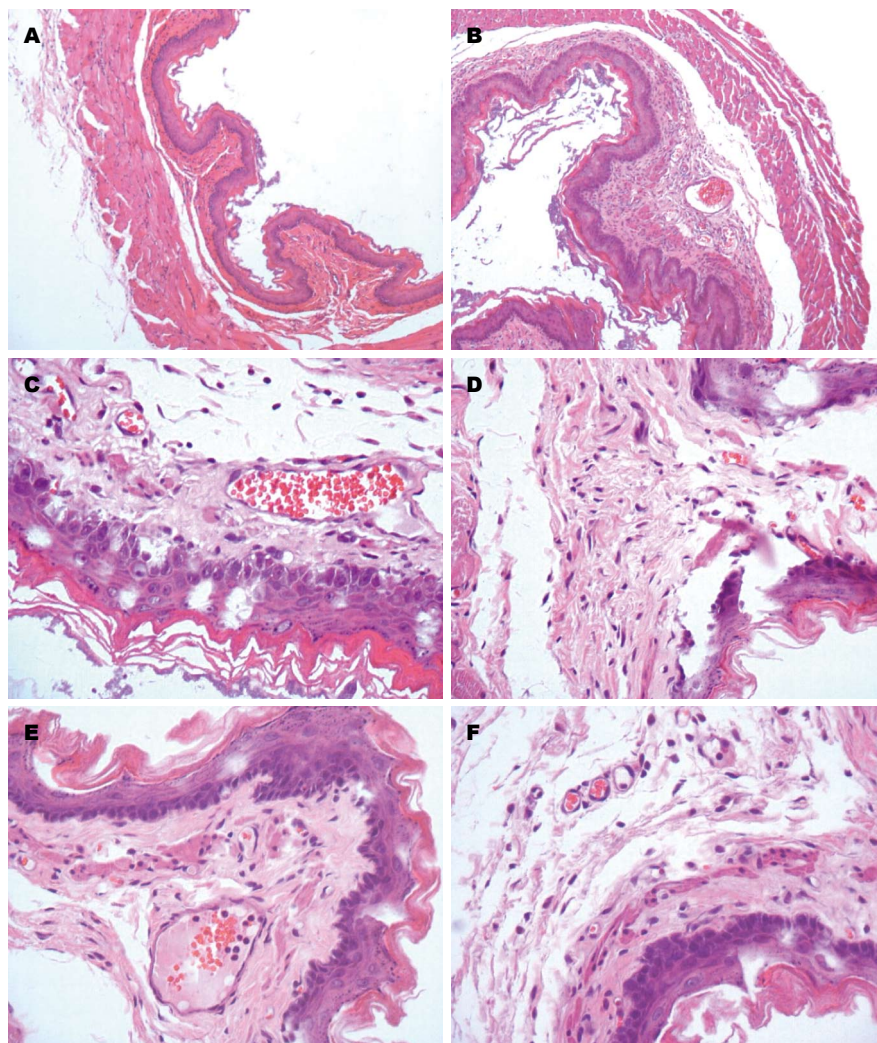


图2 不同初始<sup>125</sup>I粒子活度与照射时间放射性食管损伤的组织学变化。A: 正常对照组大鼠食管组织染色结果(HE × 100); B: 0.4 mCi组照射7 d后大鼠食管组织染色结果(HE × 100); C: 0.6 mCi组照射5 d后大鼠食管组织染色结果(HE × 400); D: 0.8 mCi组照射7d后大鼠食管组织染色结果(HE × 400); E: 0.8 mCi组照射7 d后1 wk食管组织染色结果(HE × 400); F: 0.8 mCi组照射7 d后2 wk食管组织染色结果(HE × 400)。

底细胞增生, 多边细胞层增厚, 血管轻度充血。5 d组肉眼观未见明显变化。显微镜下观察可见食管上皮黏膜层少部分断裂、缺损, 血管充血, 固有层、黏膜下层有少量炎症细胞浸润(图2C)。7 d组肉眼可见管壁红肿, 管腔内侧病变区多处糜烂。显微镜下观察可见食管上皮角化层显著增厚, 黏膜层变薄, 多边形细胞及基底细胞排列不规则, 且断裂、缺损增多, 血管充血明显。固有层、黏膜下层可见较多炎症细胞浸润, 分别为中性粒细胞和淋巴细胞。

0.8 mCi组: 3 d组肉眼食管外观未见明显改变。显微镜下观察可见角化层增厚, 黏膜层细胞增生, 血管轻度充血。固有层、黏膜下层有少量炎症细胞浸润。5 d组肉眼可见食管外观轻度红肿, 管腔内侧部分黏膜层糜烂。显微镜下观察可见黏膜层多边形细胞和基底细胞排列紊乱, 且断裂、缺损明显增多, 血管充血明显。固有层、黏膜下层可见较多炎症细胞浸润, 分别为中性粒细胞和淋巴细胞。7 d组肉眼可见食管管壁红肿, 管腔内侧部分病变区可见部分区域明显糜



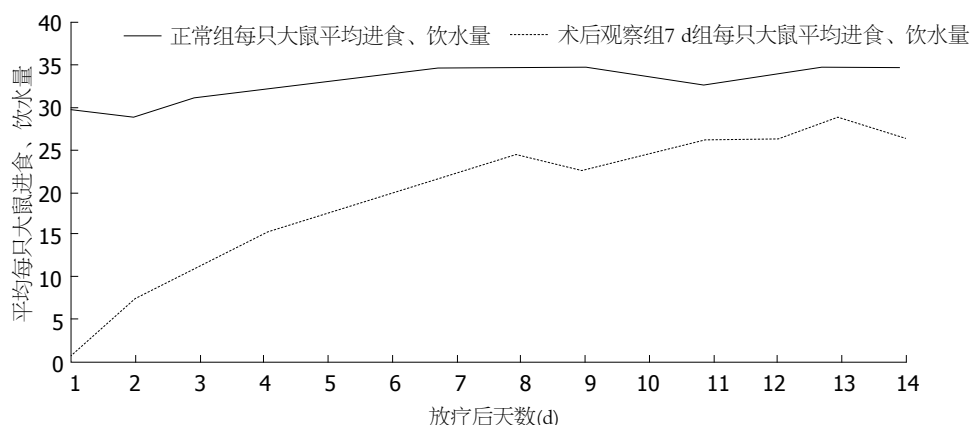


图3 平均每只大鼠每日进食、饮水量。

烂, 表面不光滑. 显微镜下观察可见上皮黏膜层变薄, 上皮层脱落的范围和深度较前面组明显加大, 血管充血明显. 固有层、黏膜下层可见较多炎症细胞浸润, 分别为中性粒细胞和淋巴细胞, 甚至肌层也可见炎症细胞浸润(图2D).

**2.4 观察组<sup>125</sup>I粒子链持续照射7 d后1、2 wk时组织病理学分析** 5颗初始活度0.8 mCi <sup>125</sup>I粒子照射7 d后1 wk肉眼可见食管壁仍有轻度红肿, 管腔内侧部分黏膜层仍有糜烂, 但较术后减轻. 显微镜下观察可见角化层增厚, 部分黏膜层区域可见断裂、缺损. 固有层、黏膜下层炎症细胞浸润明显, 以中性粒细胞和淋巴细胞为主, 毛细血管充血明显(图2E). 照射7 d后1 wk时食管损伤、炎症细胞及组织变化总积分与正常组差异有统计学意义,  $P<0.001$ . 照射7 d后2 wk肉眼食管外观较1 wk时明显好转, 仅见部分区域有轻微红肿, 管腔内侧未见明显糜烂, 黏膜较光滑. 显微镜下观察可见角质层、黏膜层变薄, 黏膜断裂、缺损明显减少. 固有层、黏膜下层仍可见少量炎症细胞浸润, 血管轻度充血. 照射7 d后2 wk与1 wk食管损伤、炎症细胞及组织变化总积分之间差异有统计学意义,  $P<0.05$ . 以上结果表明射线照射后2 wk食管黏膜上皮已开始逐渐自行修复(图2F).

**2.5 观察组<sup>125</sup>I粒子照射后2 wk内大鼠生存状况** 观察组大鼠在对应时间取出<sup>125</sup>I粒子照射装置后, 分别可见各组大鼠进食和饮水减少, 状态较正常鼠差, 随照射时间的延长而逐渐加重. 术后1、3和5 d组逐渐开始恢复进食及饮水, 后随天数增加, 进食及饮水逐渐增加. 术后第2天, 7 d组B组逐渐恢复少量饮水及进食, 但进食量较少, 后随天数增加饮水及进食量逐渐增多(图3). 以上各组大鼠在术后1 wk左右饮食基本恢复正常,

至2 wk时无死亡.

### 3 讨论

临床上对食管癌及胸部、头颈部恶性肿瘤患者进行放射治疗时, 照射野中的正常食管黏膜常发生充血、水肿, 表现为吞咽困难、局部疼痛、胸骨后烧灼感, 轻者摄入不足, 重者疼痛难以忍受, 营养不良、电解质紊乱, 甚至因此被迫停止放疗, 延误最佳治疗时机. 过去对放射性食管损伤的治疗主要采取对症支持治疗, 然而这些并不能从根本上解决问题<sup>[2]</sup>, 还可能因为治疗不及时或不当, 造成严重的食管狭窄等并发症. 随着干细胞的研究逐渐成为热点, 应用干细胞移植治疗食管放射性损伤为我们指出了一个新的研究方向<sup>[2]</sup>, 且既往的研究证实了骨髓干细胞在受过照射的损伤食管中具有一定程度归巢、增生并分化的能力<sup>[3]</sup>. 而干细胞的特异性定向分化需要我们去建立一种精确的动物放射性食管损伤模型.

以往的造模方法<sup>[4,5]</sup>主要为外照射, 照射剂量率大, 短时间内使照射野接受非常大的射线剂量, 虽然在照射过程中用铅板遮蔽了除照射野外的其他部分, 但照射范围仍不够精确, 且对照射野深度无法把握, 不可避免地造成食管周围组织同样造成较大的损伤. <sup>125</sup>I粒子是一种新型低能核素, 半衰期59.6 d, 外部有一层用0.05 mm的钛(Ti)造成的包壳, 两端用Ti密封, 保证了使用时的安全性, 其内部有一根3 mm长的银丝, 表面涂有活性物质碘化银, 能够持续释放低剂量的X射线和γ射线, 有效照射半径为15-20 mm. <sup>125</sup>I粒子放射剂量率低, 且放射剂量随距离增加而迅速衰减, 因此对粒子周围组织短时间内造成的损伤较低, 既往的多数研究<sup>[8-11]</sup>也证实了这一点.

### 同行评价

本文具有一定指导意义.



这些优点为管腔内照射造模提供了可能。

我们采用5颗 $^{125}\text{I}$ 粒子组成的粒子链放置于SD大鼠食管内,进行管腔内低剂量率持续照射,且参照沈莉等<sup>[4]</sup>使 $^{125}\text{I}$ 粒子装置仅照射大鼠食管上段2 cm,主照射野约占食管全长的25%,从而避免了对放射性射线高敏的肺的损伤。王耀明等依据美国医学物理家协会工作组43号报告(AAPM TG No. 43)及其更新报告<sup>[12,13]</sup>中的剂量计算模型以及相应的参数和实验数据,以单枚剂量计算模型为基础,利用“标量叠加”的方法,从理论上推导并得到了多枚粒子剂量计算的数学模型,为本实验剂量学奠定了理论基础。我们的实验模型中,放射性粒子与食管壁接触非常近(<0.5 mm),因此无法根据王耀明等<sup>[6]</sup>的计算公式计算准确放射剂量,但理论上1 wk内粒子周围食管组织接受到的放射剂量范围可达11-22 Gy。以往的实验中,郭金和等<sup>[8]</sup>采用2颗 $^{125}\text{I}$ 粒子照射2 wk可发现周围食管组织有炎症表现,宋永彬等<sup>[14]</sup>采用1颗 $^{125}\text{I}$ 粒子手术种植于食管处,1 wk即可发现食管炎症,而我们采用5颗粒子,且粒子的标量叠加效应将会产生更大的放射剂量,因此可以在更短时间内造成放射性食管损伤。据此,本实验选择照射3、5、7 d来进行研究。放射性食管损伤程度可通过光镜下食管组织的充血、炎性细胞浸润、黏膜层变化来判断,因此我们的实验采用单纯光镜下病理变化打分方法,评价大鼠食管放射性损伤程度,并得出0.6-0.8 mGy  $^{125}\text{I}$ 粒子链照射5 d以上可诱发放射性食管损伤。考虑到粒子活度较大对实验人员安全的影响及对大鼠损伤程度较大,因此建议实际应用时采用0.6 mGy活度 $^{125}\text{I}$ 粒子链持续照射7 d。

本实验过程中 $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置存留于大鼠食管内,由于食管的扩张性,照射期间给予大鼠流食时,对大鼠进食将无过多影响,因此可应用于液体药物防治放射性食管损伤的研究,但更适用于静脉注射药物研究,因此符合我们通过静脉移植干细胞治疗食管放射性损伤的要求。然而,本实验方法术后约有20%的大鼠死亡,考虑与自制 $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置技术不成熟,导致取出 $^{125}\text{I}$ 粒子照射装置过程中损伤食管有关。因此我们认为此种造模方法更适用于食管较粗的动物。

另一方面,目前新型低能核素 $^{125}\text{I}$ 粒子由于他的低能、安全性强等因素已被广泛应用于腔内近距离放射、食管支架联合 $^{125}\text{I}$ 粒子和肿瘤内植入 $^{125}\text{I}$ 粒子治疗食管癌的研究<sup>[15-18]</sup>,且已作为一种独立的方法被用于缓解不可治愈性食管癌的

吞咽困难症状<sup>[19]</sup>。而我们实验中的造模实验方法或许可为目前临床晚期食管癌短距离放射疗法提供一个新的思路:相对于以往较粗的食管癌管腔内放疗后装施源器<sup>[20]</sup>,我们实验方法中存在于食管腔内的粒子链放射装置较细,对食管腔本身不存在阻塞,还可极大程度上减少给患者带来的不适,且可根据需要随时、随地调整照射时间、照射部位,杀伤癌细胞,从而治疗或缓解晚期食管癌狭窄症状,达到缓解患者进食状况的目的;以往的管腔内近距离放射治疗放射源多采用 $^{226}\text{Ra}$ 、 $^{222}\text{Rn}$ 和 $^{192}\text{Ir}$ 等核素,这些核素释放高能的 $\gamma$ 射线,并发症高,临床应用受到了极大限制<sup>[6]</sup>,而我们的实验方法采用 $^{125}\text{I}$ 粒子,既往的研究也证明了他的安全性;郭金和等<sup>[8]</sup>通过动物实验证明了使用食管支架捆绑 $^{125}\text{I}$ 粒子的可行性和安全性,李强等<sup>[16]</sup>通过临床实验证明食管支架捆绑 $^{125}\text{I}$ 粒子疗效显著,然而食管支架捆绑 $^{125}\text{I}$ 粒子将会导致 $^{125}\text{I}$ 粒子无法取出,我们的实验方法在达到治疗目的后可随时取出照射装置,从而避免继续造成放射性损伤,极大地减少患者的痛苦,并在 $^{125}\text{I}$ 粒子活度降低时,可方便取出更换,保证了放射剂量的稳定性,提高了放射治疗的效率,从而更好地延长患者生命及改善患者生存质量。我们相信随着 $^{125}\text{I}$ 粒子链照射装置的逐步改进及照射方法的完善,将会为晚期食管癌患者提供一种简单易行、放疗效率高的新的治疗选择。

总之,我们认为此实验方法具有重要的临床意义。通过 $^{125}\text{I}$ 粒子链成功建立的动物急性放射性食管损伤模型将对临床有以下帮助:不仅能够为干细胞移植预防、治疗放射性食管损伤的研究提供一个良好的平台,且能够为近年来日益发展的 $^{125}\text{I}$ 粒子低能核素短距离放疗治疗食管癌提供一种新的研究方法。

#### 4 参考文献

- 1 张红,曾师. 益气活血化痰方配合复方合剂防治放射性食管炎临床观察. 中国中医药信息杂志 2010; 17: 61-62
- 2 全甲钊,曲波,金世柱. 干细胞移植治疗食管放射性损伤的研究进展. 胃肠病学和肝病学杂志 2012; 21: 495-497
- 3 Epperly MW, Guo H, Shen H, Niu Y, Zhang X, Jefferson M, Sikora CA, Greenberger JS. Bone marrow origin of cells with capacity for homing and differentiation to esophageal squamous epithelium. *Radiat Res* 2004; 162: 233-240 [PMID: 15333000]
- 4 沈莉,单保恩,张莉,卢付河,董稚明,高国栋. 放射性食管炎动物模型的构建. 中华肿瘤防治杂志 2007; 14: 13-16

- 5 路军章, 赵丽, 任建平, 曹秀堂, 李海霞, 赵红. 复方竹叶石膏颗粒对大鼠放射性食管炎的防治作用. 中西医结合学报 2011; 9: 435-441
- 6 王耀明, 王莉, 胡楠, 丛云峰, 孙士恒, 原龙. 125I粒子链管内近距离治疗剂量分布的计算研究. 当代医学 2011; 17: 79-81
- 7 Trowers E, Thomas C, Silverstein FE. Chemical- and radiation-induced esophageal injury. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1994; 4: 657-675 [PMID: 7812640]
- 8 郭金和, 滕皋军, 朱光宇, 何仕诚, 邓钢, 方文. 食管内照射支架的研制及动物实验研究. 中华放射学杂志 2006; 40: 550-555
- 9 高斌, 李劲松, 巢惠民, 胡永胜, 徐圣德, 季亚莉. CT导向下125I粒子植入术治疗恶性肿瘤. 医学影像学杂志 2006; 6: 469-471
- 10 孙常波, 吕宾, 包海标, 倪桂宝, 任永葆. 125I粒子覆膜支架对正常兔食管组织的放射性损伤实验研究. 中华消化内镜杂志 2008; 25: 366-369
- 11 吕进, 曹秀峰, 朱斌, 王冬冬, 纪律, 王山, 安红银. 术中125I粒子植入联合术后化学治疗中晚期食管鳞癌. 中华消化杂志 2011; 31: 173-177
- 12 Nath R, Anderson LL, Luxton G, Weaver KA, Williamson JF, Meigooni AS. Dosimetry of interstitial brachytherapy sources: recommendations of the AAPM Radiation Therapy Committee Task Group No. 43. American Association of Physicists in Medicine. *Med Phys* 1995; 22: 209-234 [PMID: 7565352 DOI: 10.1118/1.597458]
- 13 Rivard MJ, Coursey BM, DeWerd LA, Hanson WF, Huq MS, Ibbott GS, Mitch MG, Nath R, Williamson JF. Update of AAPM Task Group No. 43 Report: A revised AAPM protocol for brachytherapy dose calculations. *Med Phys* 2004; 31: 633-674 [PMID: 15070264]
- 14 宋永彬, 柳立军, 王志康. 放射性125I粒子植入对兔正常气管、食管、大动脉组织结构急性损伤的实验研究. 第一届中国肿瘤微创治疗研讨会暨中国抗癌协会肿瘤微创治疗专业委员会成立大会论文集 2005: 317-322
- 15 肖泽芬, 苗延俊, 王亚非, 冯宁远, 欧阳汉, 罗斗强. 食管癌腔内放射治疗技术的改进. 中华放射肿瘤学杂志 2000; 9: 29-32
- 16 李强, 陈士新, 赵永昌, 胡晓, 王亚莉, 冷保山, 张玉云, 王执民, 张洪新. 内放疗支架治疗食管癌的临床应用. 介入放射学杂志 2010; 19: 230-232
- 17 吕进, 曹秀峰, 朱斌, 纪律, 安红银. 术中联合125I粒子植入治疗中晚期食管鳞状细胞癌前瞻性研究. 中华外科杂志 2010; 48: 338-341
- 18 吕进, 曹秀峰, 朱斌, 纪律, 肖建, 王冬冬, 陶磊, 王山, 安红银. 放射性125I粒子治疗食管鳞癌的安全性及疗效. 世界华人消化杂志 2010; 18: 3065-3071
- 19 Siersema PD. New developments in palliative therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 959-978 [PMID: 16997172 DOI: 10.1016/j.bpg.2006.07.005]
- 20 张可领, 金治宁. 食管癌腔内近距离放疗的方法和剂量. 医学综述 2002; 8: 266-267

编辑 田滢 电编 鲁亚静



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

## • 消息 •

## 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.775

**本刊讯** 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2011年《世界华人消化杂志》总被引频次3871次, 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第5位、第7位、第5位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第65位、第238位、第138位; 其他指标: 即年指标0.081, 他引率0.82, 引用刊数526种, 扩散因子13.59, 权威因子1260.02, 被引半衰期4.3, 来源文献量642, 文献选出率0.93, 地区分布数29, 机构分布数302, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技核心期刊”(《世界华人消化杂志》编辑部)。

# 厄贝沙坦对糖尿病胃轻瘫大鼠ET-1和AT1R表达的影响

何莉莉, 朱雅娜, 任荣, 张玉, 王飞, 李媛, 张艺凡, 孙玉凤

## ■背景资料

胃轻瘫是临床上糖尿病的常见并发症, 其临床表现为恶心、呕吐、早饱、腹胀、腹痛等, 这些症状不仅严重影响患者的生活质量, 还会引起血糖波动, 促进糖尿病其他慢性并发症的发生和发展。因此在探讨胃轻瘫的临床诊治有着重要意义。厄贝沙坦是临床上治疗原发性高血压、糖尿病合并高血压及肾病常用药, 其是否能够改善糖尿病胃轻瘫, 国内外未见相关报道。

何莉莉, 朱雅娜, 任荣, 张玉, 王飞, 李媛, 孙玉凤, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省消化病重点实验室 河北省石家庄市 050000

张艺凡, 河北省石家庄市中心医院中西医结合内科 河北省石家庄市 050000

何莉莉, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由孙玉凤、何莉莉、朱雅娜、任荣及张玉设计; 研究过程、资料查找及数据统计由何莉莉、朱雅娜、任荣、张玉、王飞、李媛及张艺凡共同完成; 本论文写作由何莉莉完成; 孙玉凤审核。

通讯作者: 孙玉凤, 教授, 主任医师, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科。

sunyf789@yahoo.com.cn

电话: 0311-66002951

收稿日期: 2013-01-04 修回日期: 2013-01-30

接受日期: 2013-02-01 在线出版日期: 2013-03-28

## Effect of irbesartan on expression of ET-1 and AT1R in gastric tissues of diabetic rats with gastroparesis

Li-Li He, Ya-Na Zhu, Rong Ren, Yu Zhang, Fei Wang, Yuan Li, Yi-Fan Zhang, Yu-Feng Sun

Li-Li He, Ya-Na Zhu, Rong Ren, Yu Zhang, Fei Wang, Yuan Li, Yu-Feng Sun, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Gastroenterology, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Yi-Fan Zhang, Combination of Traditional Chinese and Western Medicine Department, the Central Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Yu-Feng Sun, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Hebei Key Laboratory of Gastroenterology, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. sunyf789@yahoo.com.cn

Received: 2013-01-04 Revised: 2013-01-30

Accepted: 2013-02-01 Published online: 2013-03-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the therapeutical effect of irbesartan on diabetic gastroparesis (DG) in rats and to explore potential mechanisms involved.

**METHODS:** Thirty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into either a normal control group (NC group,  $n = 10$ ) or a diabetes mellitus group (DM group,  $n = 20$ ). Diabetes mellitus was induced with streptozotocin (50 mg/kg i.p.). The DM group was further divided into a diabetic control group (DC group,  $n = 10$ )

and an irbesartan group (DI group,  $n = 10$ ). The DI group was given irbesartan 0.012 g/(kg·d) through stomach feeding, while the NC and DC groups were given equal volume of saline by gavage. Six weeks later, all the rats were administered with phenol red solution to measure the rate of gastric emptying. Endothelin (ET-1) content in stomach tissue was measured by radioimmunoassay. Chemical colorimetry was used to measure the activity of nitric oxide synthase (NOS) in the stomach tissue. The expression level of angiotensin receptor (AT1R) mRNA was determined by RT-PCR.

**RESULTS:** Compared to the NC group, the rate of gastric emptying significantly decline in the other two groups ( $62.64\% \pm 4.51\%$  vs  $18.65\% \pm 4.30\%$ ,  $22.64\% \pm 2.88\%$ ); however, the rate of gastric emptying was significantly higher in the DI group than in the DC group ( $22.64\% \pm 2.88\%$  vs  $18.65\% \pm 4.30\%$ ). There was a significant difference in ET-1 content among the three groups (NC  $18.520$  pg/mgpro  $\pm 2.795$  pg/mgpro vs DC  $26.850$  pg/mgpro  $\pm 2.897$  pg/mgpro vs DI  $21.660$  pg/mgpro  $\pm 4.686$  pg/mgpro). Compared to the NC group, cNOS activity significantly declined in the DC and DI groups ( $0.521$  pg/mgpro  $\pm 0.057$  pg/mgpro vs  $0.323$  pg/mgpro  $\pm 0.079$  pg/mgpro,  $0.384$  pg/mgpro  $\pm 0.067$  pg/mgpro); however, there was no significant change in cNOS activity between the DC and DI groups ( $0.323$  pg/mgpro  $\pm 0.079$  pg/mgpro vs  $0.384$  pg/mgpro  $\pm 0.067$  pg/mgpro). iNOS activity in the DI group was significantly lower than that in the DC group ( $0.246$  pg/mgpro  $\pm 0.033$  pg/mgpro vs  $0.276$  pg/mgpro  $\pm 0.021$  pg/mgpro), but higher than that in the NC group ( $0.246$  pg/mgpro  $\pm 0.033$  pg/mgpro vs  $0.209$  pg/mgpro  $\pm 0.015$  pg/mgpro). The expression of AT1R mRNA in DC group and DI group was up-regulated significantly ( $0.741 \pm 0.010$ ,  $0.546 \pm 0.005$  vs  $0.207 \pm 0.004$ ) compared with the NC group. After intervention with irbesartan, the level of AT1R mRNA in the DI group was lower than that in the DC group ( $0.546 \pm 0.005$  vs  $0.741 \pm 0.010$ ).

**CONCLUSION:** Irbesartan can improve, to some extent, gastric emptying in rats with diabetic gas-

## ■同行评议者

郝丽萍, 副教授, 华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系



troparesis possibly by altering the levels of ET, NOS, and AT1R mRNAs in the stomach tissue.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Diabetes mellitus; Diabetic gastroparesis; Irbesartan; Gastric evacuation rate; Endothelin; Nitric oxide synthase; Angiotensin receptor

He LL, Zhu YN, Ren R, Zhang Y, Wang F, Li Y, Zhang YF, Sun YF. Effect of irbesartan on expression of ET-1 and AT1R in gastric tissues of diabetic rats with gastroparesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 798-803 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/798.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.798>

## 摘要

**目的:** 研究厄贝沙坦对糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis, DG)的治疗作用及其可能的作用机制。

**方法:** 30只健康♂SD大鼠予链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)腹腔注射, 制备糖尿病大鼠模型。随机分为正常对照组(NC组)、糖尿病模型对照组(DC组)、厄贝沙坦治疗组(DI组), DI组予以厄贝沙坦按0.012 g/(kg·d)灌胃, 其余两组给予等体积生理盐水灌胃。6 wk后, 行酚红灌胃法测胃排空率; 放射免疫分析法测定大鼠胃组织内皮素(ET-1)含量、化学比色法检测胃组织一氧化氮合酶(NOS)活性、反转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定胃组织血管紧张素受体(AT1R)mRNA表达。

**结果:** DC组及DI组的胃排空率较NC组明显下降( $18.65\% \pm 4.30\%$ ,  $22.64\% \pm 2.88\%$  vs  $62.64\% \pm 4.51\%$ ), 而与DC组相比, DI组的胃排空率明显升高( $22.64\% \pm 2.88\%$  vs  $18.65\% \pm 4.30\%$ ); DI组胃组织ET-1含量较DC组明显下降( $21.660 \text{ pg/mgpro} \pm 4.686 \text{ pg/mgpro}$  vs  $26.850 \text{ pg/mgpro} \pm 2.897 \text{ pg/mgpro}$ ), 但是仍高于NC组( $21.660 \text{ pg/mgpro} \pm 4.686 \text{ pg/mgpro}$  vs  $18.520 \text{ pg/mgpro} \pm 2.795 \text{ pg/mgpro}$ ); NOS分为结构性NOS(cNOS)和诱导性(iNOS), 与NC组相比, DC组、DI组cNOS活性显著下降( $0.521 \text{ pg/mgpro} \pm 0.057 \text{ pg/mgpro}$  vs  $0.323 \text{ pg/mgpro} \pm 0.079 \text{ pg/mgpro}$ ,  $0.384 \text{ pg/mgpro} \pm 0.067 \text{ pg/mgpro}$ ), DI组cNOS活性较之DC组没有显著差异( $0.323 \text{ pg/mgpro} \pm 0.079 \text{ pg/mgpro}$  vs  $0.384 \text{ pg/mgpro} \pm 0.067 \text{ pg/mgpro}$ ), 而DI组iNOS活性较DC组明显下降( $0.246 \text{ pg/mgpro} \pm 0.033 \text{ pg/mgpro}$  vs  $0.276 \text{ pg/mgpro} \pm 0.021 \text{ pg/mgpro}$ ), 但仍高于NC组( $0.246 \text{ pg/mgpro} \pm 0.033 \text{ pg/mgpro}$  vs  $0.209 \text{ pg/mgpro} \pm 0.015 \text{ pg/mgpro}$ ); 厄贝沙

坦干预后, DI组胃组织(AT1R)mRNA表达低于DC组, 差异有统计学意义( $0.546 \pm 0.005$  vs  $0.741 \pm 0.010$ ), 而仍显著高于NC组( $0.546 \pm 0.005$  vs  $0.207 \pm 0.004$ )。

**结论:** 厄贝沙坦可能通过影响DG大鼠胃组织ET-1、NOS、AT1R mRNA水平来改善DG大鼠的胃排空障碍。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 糖尿病; 胃轻瘫; 厄贝沙坦; 胃排空率; 内皮素; 一氧化氮合酶; 血管紧张素受体

何莉莉, 朱雅娜, 任荣, 张玉, 王飞, 李媛, 张艺凡, 孙玉凤. 厄贝沙坦对糖尿病胃轻瘫大鼠ET-1和AT1R表达的影响. *世界华人消化杂志* 2013; 21(9): 798-803 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/798.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.798>

## 0 引言

胃轻瘫(gastroparesis)是在排除胃机械性梗阻的情况下, 出现的以胃排空延迟主要特征的慢性疾病。其中糖尿病是引起胃轻瘫的3大主要病因之一<sup>[1]</sup>。已有报道显示: 胃轻瘫在糖尿病患者中发病率高达90%<sup>[2]</sup>。糖尿病胃轻瘫(diabetic gastroparesis, DG)是由Kassmader在1958年首次提出的, 已被公认为糖尿病的并发症之一<sup>[3]</sup>。目前医学界普遍认为DG的发病机制现主要认为与迷走副交感神经功能失调、高血糖、肠神经元的表达缺失、平滑肌异常、Cajal肠间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICCs)病变、激素异常、微血管病变等因素有关<sup>[4]</sup>, 其中有关胃微血管病变在DG发病机制研究的报道较少, 胃微循环是保证胃内平滑肌细胞、神经细胞及其他参与胃的舒缩活动的细胞正常功能的基础。因此我们认为正常的胃微循环是保持胃动力的基础。糖尿病微血管病变常见于眼、肾, 也可见于消化系, 主要的病理特征是内皮功能受损<sup>[5]</sup>。ET-1与NO是反映血管内皮功能的一对有价值的指标, 都由内皮细胞产生。NO的主要功能是使血管平滑肌舒张, 抑制血管平滑肌增殖, 能够使胃血流保持在一定水平; ET是血管内皮细胞损伤的标志物, 是迄今所知体内最强、持续时间最长的缩血管物质, 其大量的分泌能够造成血流淤滞, 使胃肠道缺血, 胃平滑肌细胞受损, 影响平滑肌舒缩功能, 可导致胃动力障碍。血管紧张素-II(angiotensin, Ang-II), 在病理条件下可促进内皮细胞分

## ■研发前沿

糖尿病胃轻瘫治疗在临床上越来越受到重视, 其多采用在控制血糖的基础上应用促胃动力药物, 包括多巴胺受体拮抗剂、52羟色胺(5HT<sub>4</sub>)受体激动剂、胃动素受体激动剂和抗胆碱药等, 但是疗效并不十分理想, 因此糖尿病胃轻瘫的治疗是临床上一大难点。

## ■相关报道

翟振艳等指出血管紧张素受体拮抗剂除了有降压作用外, 对血管内皮细胞有确实的保护作用, 有助于减少微血管和大血管并发症的发生。

## ■创新盘点

本文从厄贝沙坦改善血管内皮作用方面,联系糖尿病胃轻瘫发病机制来探讨厄贝沙坦治疗胃轻瘫的发病机制。

泌ET, 激活ROS可以降低内皮细胞一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)活性, 清除内皮细胞NO, 从而抑制内皮细胞活力。而Ang II主要通过血管紧张素受体(angiotensin receptor, ATR)主要是AT1R结合来发挥生物学效应的, 即AT1R的表达水平决定了Ang II的生物学效能。厄贝沙坦是血管紧张素受体拮抗剂, 国内外已有研究表明血管紧张素受体拮抗剂能够改善血管内皮功能, 有助于减少微血管并发症<sup>[6,7]</sup>, 而且厄贝沙坦是临床上治疗糖尿病并发心血管疾病及肾病的常用药, 但是作为糖尿病并发症之一的胃轻瘫, 厄贝沙坦对其是否也有一定的治疗作用, 国内外未见报道。本实验采用厄贝沙坦对DG大鼠进行干预, 通过观察其对DG大鼠胃组织ET-1、AT1R mRNA水平变化及NOS活性的影响来探讨厄贝沙坦对DG可能的治疗作用。

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠(SPF级)30只, 体质量201-205 g, 由河北医科大学实验动物中心提供(动物合格证编号: 1112061), 安博维(杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药公司), TURE script 1st Strand cDNA Synthesis Kit(Reagents公司), NOS测定试剂盒(南京建成生物工程研究所), TRIzol试剂(Invitrogen公司), 2×Tap PCR Master Mix(Reagents公司), 碘<sup>[125I]</sup>内皮素放射免疫分析法药盒(北京华埠力特生物技术研究所), 凝胶分析系统(UVP公司, 美国)。

### 1.2 方法

1.2.1 建模: 将大鼠随机分为正常对照组( $n = 10$ )、糖尿病模型组( $n = 10$ )和厄贝沙坦治疗组( $n = 10$ ), 均予以普通饲料(由河北医科大学实验动物中心提供)喂养, 适应性喂养2 wk后, 糖尿病模型组和厄贝沙坦组大鼠空腹一次性腹腔注射1%STZ(购自美国sigma公司, 以0.1 mmol/L pH为4.4的柠檬酸缓冲液配制而成)溶液50 mg/kg, 正常组大鼠仅注射相同体积的柠檬酸缓冲液(pH 4.4, 0.1 mmol/L)。72 h后, 采大鼠尾静脉血, 测定随机血糖,  $\geq 16.19$  mmol/L确立糖尿病模型建立。

1.2.2 给药方法: 造模成功后, 厄贝沙坦组予以0.012 g/(kg·d)灌胃, 正常对照组和糖尿病模型组给予等体积生理盐水灌胃。每日10:00给药一次, 共6 wk。实验结束时测胃排空率及取动物血清和胃组织。

1.2.3 观察指标和方法: (1)一般情况: 观察大鼠一般情况包括: 精神状态、活动情况、饮食、毛

色、饮水量、尿量等; (2)体质量: 称量各组大鼠给药前后体质量, 计算体质量变化; (3)生化指标测定: 血糖(blood glucose, BG)、血清肌酐(serum creatinine, Scr)、胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(total triglyceride, TG), 用Beckman cx7全自动生化分析仪测定; (4)酚红灌胃法检测胃排空率(gastric emptying rate, GER): 于第6周末, 禁食16-24 h、禁水2 h后, 予大鼠500 mg/L酚红溶液2 mL灌胃, 15 min后处死大鼠, 剖腹, 结扎贲门和幽门, 取出整个鼠胃, 沿胃大弯切开, 以蒸馏水冲洗胃内容物, 定容为20 mL。加入20 mL 0.5 mol/L氢氧化钠搅拌均匀, 静置1 h。取5 mL上清液, 加入0.5 mL 20%三氯乙酸去蛋白, 3 500 r/min离心10 min, 取上清液, 以分光光度计于560 nm波长处测定吸光度(A)值(实测值), 另取2 mL酚红溶液加入18 mL蒸馏水、20 mL 0.5 mol/L氢氧化钠、4 mL 20%三氯乙酸, 搅拌均匀, 测定A值(标准酚红A值)。大鼠GER = (1-实测酚红A值/标准酚红A值)×100%; (5)放射免疫法测胃组织ET含量: 胃组织总蛋白提取: 取-80 °C冻存的胃组织标本100 mg, 置于1-2 mL匀浆器中, 用干净的剪刀将组织块尽量剪碎。加1 mL RIPA和10  $\mu$ L PMSF于匀浆器中, 在低温下进行匀浆。将匀浆彻底后的液体移至1.5 mL EP管中, 然后在4 °C下10 000 r/min离心10-20 min, 上清液即为所提取的蛋白溶液; 胃组织ET含量测定: 将冷冻于-80 °C冰箱的组织提取液分别取出后置于冷水中复融, 混匀, 再次4 °C 3 000 r/min离心20 min, 取上清分装后用于测定。放免测定采用非平衡法, 具体操作步骤按碘<sup>[125I]</sup>内皮素放射免疫分析法药盒说明操作, 最后结果算出每毫克蛋白中ET-1含量; (6)化学比色法用于胃组织NOS活力测定: NOS催化L-Arg和分子氧反应生成NO, NO与亲核性物质生成有色化合物, 在530 nm波长下测定A值, 然后除以每毫升胃组织蛋白含量, 算得胃组织NOS活力。具体步骤按NOS测定试剂盒说明操作。组织NOS酶活力计算定义为: 每毫克组织蛋白每分钟生成1 nmol NO为一个酶活力单位; (7)RT-PCR法检测胃组织AT1R mRNA表达: 以TRIzol试剂按说明提取总RNA, 按201  $\mu$ L反应体系加RNA 2  $\mu$ L, 参照TURE script 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明操作, 反应条件: 42 °C 30 min(cDNA合成), 99 °C 5 min(逆转录酶失活), 5 °C 5 min。然后对cDNA进行扩增; 取cDNA 2  $\mu$ L, 2×Tap PCR Master Mix 10  $\mu$ L, 目的基因和对应内参的上、下游引

## ■应用要点

本文从厄贝沙坦改善糖尿病胃轻瘫方面, 为厄贝沙坦临床应用提供新的思路。

表 1 各组大鼠体重、BG、TG、TC、Scr比较 (mean ± SD)

分组	n	体重(g)		BG(mmol/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	Scr(μmol/L)
		实验前(n = 30)	实验后				
NC	10	202.39 ± 0.80	289.85 ± 6.43	6.02 ± 1.09	0.90 ± 0.05	1.19 ± 0.09	71.62 ± 1.82
DC	8	203.86 ± 0.76	133.29 ± 6.14 <sup>a</sup>	22.09 ± 2.30 <sup>a</sup>	2.39 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.04 ± 0.04 <sup>a</sup>	90.73 ± 1.31 <sup>a</sup>
DI	9	203.18 ± 0.78	167.32 ± 4.92 <sup>ac</sup>	21.64 ± 2.88 <sup>a</sup>	2.34 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.02 ± 0.03 <sup>a</sup>	77.44 ± 2.48 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs NC组; <sup>c</sup>P<0.05 vs DC组. BG: 血糖; Scr: 血清肌酐; TC: 胆固醇; TG: 甘油三酯。

表 2 各组大鼠GER、ET、NOS、AT1R mRNA比较 (mean ± SD)

分组	n	GER(%)	ET(pg/mgpro)	iNOS(pg/mgpro)	cNOS(pg/mgpro)	AT1R/β-actin ratio
NC	10	62.64 ± 4.51	18.520 ± 2.795	0.209 ± 0.015	0.521 ± 0.057	0.207 ± 0.004
DC	8	18.65 ± 4.30 <sup>a</sup>	26.850 ± 2.897 <sup>a</sup>	0.276 ± 0.021 <sup>a</sup>	0.323 ± 0.079 <sup>a</sup>	0.741 ± 0.010 <sup>a</sup>
DI	9	22.64 ± 2.88 <sup>ac</sup>	21.660 ± 4.686 <sup>ac</sup>	0.246 ± 0.033 <sup>ac</sup>	0.384 ± 0.067 <sup>a</sup>	0.546 ± 0.005 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs NC组; <sup>c</sup>P<0.05 vs DC组. GER: 胃排空率; ET: 胃组织内皮素; iNOS: 诱导性一氧化氮合酶; cNOS: 结构性一氧化氮合酶。

物(20 μmol/L)各1 μL, 用DEPC水补至20 μL. 反应条件: AT1R: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性40 s, 56 °C退火50 s, 72 °C延伸90 s, 循环30次, 72 °C延伸10 min. GAPDH: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性40 s, 59 °C退火50 s, 72 °C延伸90 s, 循环30次, 72 °C延伸10 min. PCR产物在含x-gal的1%琼脂糖凝胶中电泳后, 置于凝胶分析系统进行吸光度扫描, 用目的基因吸光度与内参(β-actin)A值的比值来表示目的基因相对表达含量. GAPDH被用做对照. AT1R mRNA的引物序列为: sense 5'-CCAGCGTCAGTTTCAATC-3'; antisense 5'-TAGGGCTTTCCAAATAAGAGTA-3'(扩增片段为350 bp); 内参β-actin的引物序列: sense 5'-CCTTCATTGACCTCAACTAC-3'; antisense 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3'(扩增片段为594 bp)。

**统计学处理** 应用SPSS13.0软件. 计量资料符合正态分布, 方差齐, 用mean ± SD表示, 组间比较采用单因素方差分析, 差别有统计学意义的, 可进一步做两两比较, 应用SNK法, α = 0.05。

## 2 结果

**2.1 大鼠的一般情况** 对照组大鼠饮食正常, 眼睛有神, 活动自如, 被毛紧披有光泽, 肌肉丰满, 粪便呈麦粒状, 尿量正常. 其他两组被注射STZ后, 均出现了明显的多饮、多食、多尿症状, 并逐渐出现精神萎靡, 反应迟钝. 实验结束前, 与对照组相比, 造模各组大鼠, 肌肉较少, 骨骼突出,

上述症状以模型组最为突出. 治疗期间, 由于高血糖不能耐受, 模型组死亡2只, 实验组动物死亡1只。

**2.2 各组大鼠BW、BG、TG、TC及Scr比较** 实验开始前, 正常对照组与实验组大鼠体质量没有明显差别(P>0.05). 与NC组相比, DC组与DI组大鼠体质量明显下降(P<0.05); DI组大鼠体质量明显增加, 与DC组相比有统计学意义(P<0.05). 与NC组相比, DC组与DI组大鼠血糖、血脂水平明显升高(P<0.05); 与DC组相比, DI组大鼠血糖没有明显变化(P>0.05). 同样, 厄贝沙坦干预后, 大鼠TC、TG水平与DC组相比并没有显著差别(P>0.05). 厄贝沙坦治疗后大鼠血清肌酐含量, 与DC组相比明显下降(P<0.05); 而与NC组相比, DI组与DC组肌酐水平显著升高(P<0.05, 表1)。

**2.3 各组大鼠胃排空率及胃组织ET、NOS、AT1R mRNA表达的比较** DC组与DI组的胃排空率较正常对照组明显下降(P<0.05), 与DC组比较, DI组胃排空率明显提高(P<0.05). 与NC组比较, 其余各组胃组织中ET-1含量明显增加(P<0.05); DI组胃组织中ET含量较DC组明显减少(P<0.05). NOS是由cNOS和iNOS组成, 实验结果显示: 与NC组相比, 所有糖尿病大鼠胃组织cNOS活性明显降低(P<0.05), iNOS活性明显升高(P<0.05), 而经厄贝沙坦治疗后的大鼠cNOS活性没有明显改善(P<0.05), iNOS活性却显著降低(P>0.05, 表2). 以相对密度值对AT1R mRNA表达进行半定量



### ■名词解释

胃排空: 食物由胃排入十二指肠的过程称为胃排空。食物刺激胃壁是促进胃排空的动力, 当幽门括约肌开放, 胃运动加强, 胃内压大于十二指肠压时, 胃内容物即可进入十二指肠, 而进入十二指肠的胃内容物通过肠壁的各种感受器, 反射性引起胃运动减弱, 排空减慢, 对胃的运动和排空起抑制作用。

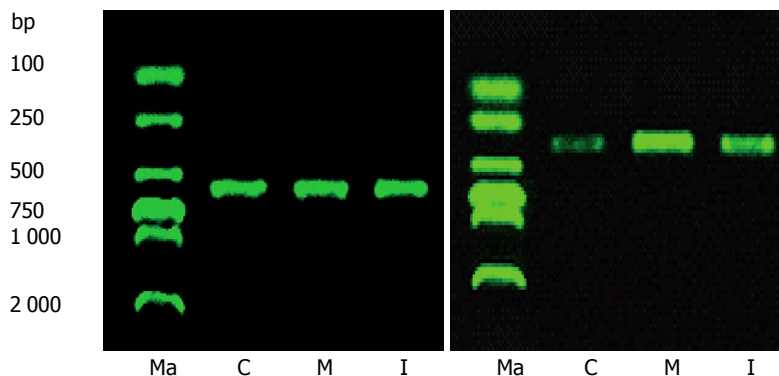


图1  $\beta$ -actin和AT1R mRNA的表达。Ma: DNA marker, C: NC组; M: DM组; I: DI组。

分析, 结果显示: 经厄贝沙坦治疗后大鼠胃组织AT1R mRNA表达与DC组相比明显下降( $P < 0.05$ ), 但仍高于NC组( $P < 0.05$ , 图1, 表2)。

### 3 讨论

糖尿病胃轻瘫是临床上糖尿病患者常见的一种慢性并发症, 其主要病理特点是胃动力下降、胃排空延迟、胃节律紊乱, 从而导致胃潴留。常见的症状有早饱、恶心、腹胀、呕吐、食欲不振等, 也可以仅有胃动力的障碍而无明显临床症状。近几年来随着医学检测技术的进步, DG的检出率随之上升, 因此其诊断和治疗也日益受到重视, 但是DG的发病机制尚未完全清楚, 主要与神经病变、胃肠激素异常、高血糖、胃微血管和平滑肌病变、Cajal间质细胞缺失、幽门螺杆菌感染等有关<sup>[8]</sup>。其中胃的微血管变引起的DG报道较少, 目前认为糖尿病微血管损伤常常是引起并发症的重要的病理生理基础。糖尿病微血管病变可以见于眼、肾脏和神经等全身多处部位, 亦可见于胃肠道。糖尿病性微循环障碍造成的局部缺血和神经营养的减弱或丧失可导致胃壁平滑肌细胞变性, 从而影响平滑肌的正常舒缩功能, 同时微循环障碍还可通过影响胃肠自主神经对DG的发生发展起促进作用<sup>[9]</sup>。

血管内皮损伤是糖尿病微血管病变的重要病理基础, ET-1与NO是反映血管内皮功能的一对有价值的指标, 均由内皮细胞释放。其中ET是21个氨基酸组成的肽家族, ET-1为主要亚型, 血管内皮细胞仅产生ET-1, 是至今发现的最强的缩血管物质, 且又能刺激血管内皮细胞及血管平滑肌细胞的生长; 而NO是一种高度活跃的自由基, 有脂溶性容易通过细胞膜, 具有舒张血管的功能, 能够抑制血管平滑肌细胞增殖, 他由NOS以左旋精氨酸(L-Arg)为底物催化生成, NOS同工酶分别为神经元型NOS(nNOS)、

内皮型NOS(eNOS)和诱导型NOS(iNOS), 其中nNOS和eNOS为结构性NOS(cNOS)。一般认为, cNOS介导的NO的释放是生理的, 其产量少, 作用持续而缓和; iNOS产生的NO是病理性的, 产量多, 易产生细胞毒性作用。ET和NO作为维持血管舒缩功能的重要活性物质, 在正常的情况下均处于动态的平衡, 能够共同保持血管的正常状态和功能<sup>[10]</sup>; 当ET轴及NO系统信号通路异常, 两者平衡关系被打破, 将会引起血管内皮功能紊乱、内皮脱落坏死和内皮下层各种成分暴露等血管壁正常结构的破坏; 血管内局部的缺氧和代谢物的堆积、血小板聚集等等将最终导致微循环障碍<sup>[11]</sup>。糖尿病状态下, 肾素-血管紧张素系统(RAS)异常活跃, 导致循环中Ang II含量及活性增加, Ang II同样作为最重要的缩血管活性物质之一, 可刺激其他收缩因子如ET1等的产生增多, 其机制与其能刺激血管细胞ET前体的转录有关<sup>[12]</sup>; 而且在Ang II刺激下, 内皮细胞病理性酶iNOS表达增高, 其催化产生NO能和O<sup>2</sup>·反应形成过氧亚硝基(ONOO·), 再快速分解成羟自由基(OH·), 在体内诱导巯基氧化和脂质过氧化而引起内皮细胞损伤<sup>[13]</sup>。Ang II导致血管内皮功能障碍的生物效应主要是通过AT1R结合实现的, AT1R主要表达在血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMCs)、内皮细胞等<sup>[14]</sup>。AT1R属G蛋白偶联家族, 与Ang II结合后, 激活G蛋白, 通过三磷酸肌醇和乙酰甘油, 激活细胞内的两条信号通路: 一条是钙离子释放激活蛋白激酶C, 引起蛋白质合成; 另一条是通过蛋白激酶的级联放大激活丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK), MAPK进入细胞核内促进许多原癌基因的表达, 进一步促进细胞的分裂和增生<sup>[15]</sup>, 又可介导内皮功能障碍<sup>[16]</sup>。厄贝沙坦是高选择性Ang II受体抑制剂, 是临床糖尿病治疗的常用药, 能抑制

Ang I 转化为Ang II, 通过选择性地阻断Ang II与AT1R的结合, 抑制血管收缩和醛固酮的释放, 减轻肾脏的高灌注、高滤过状态, 减少蛋白尿, 延缓糖尿病肾病的进展<sup>[17]</sup>, 同时能够改善胰岛素抵抗及糖、脂代谢紊乱<sup>[18]</sup>, 可以保护血管内皮功能<sup>[19]</sup>.

本实验结果显示: 应用厄贝沙坦后, DG大鼠胃排空率有一定改善, 但仍低于正常对照组; 胃组织ET-1含量明显减少, iNOS活性显著降低, AT1R mRNA表达明显减弱, 但仍高于正常对照组. 这表明, 厄贝沙坦通过阻断Ang II与其受体结合而抑制Ang II的生物学效应, 减少了ET-1及AT1R mRNA表达, 同时减弱iNOS活性以减少病理性NO的释放而减轻其对内皮细胞的损伤, 最终结果达到了厄贝沙坦对胃组织微循环的保护作用, 预防胃壁平滑肌细胞变性以维持平滑肌的舒缩功能而改善DG大鼠的胃排空. 本实验中糖尿病大鼠血清肌酐含量较模型组明显下降, 表明对其肾功能保护作用, 这与之前的文献报道一致<sup>[20]</sup>; 但是对糖尿病大鼠血脂并没有显著改善, 与之前的文献报道不一致<sup>[21]</sup>, 可能与其用药剂量和时间有关; 另外厄贝沙坦干预后, DG大鼠体重明显增加, 可能与其改善胃排空后增加食量有关. 因此厄贝沙坦治疗DG大鼠胃动力障碍可能与其影响胃微循环障碍有关, 其机制有待于进一步探讨.

#### 4 参考文献

- 1 Waseem S, Moshiree B, Draganov PV. Gastroparesis: current diagnostic challenges and management considerations. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 25-37 [PMID: 19115465 DOI: 10.3748/wjg.15.25]
- 2 张万方, 黄伟文, 熊玉冰. 糖尿病胃动力障碍的症状流行病学调查分析. *国际医药卫生导报* 2009; 15: 97-101
- 3 Kashyap P, Farrugia G. Diabetic gastroparesis: what we have learned and had to unlearn in the past 5 years. *Gut* 2010; 59: 1716-1726 [PMID: 20871131 DOI: 10.1136/gut.2009.199703]
- 4 Ma J, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M. Diabetic gastroparesis: diagnosis and management. *Drugs* 2009; 69: 971-986 [PMID: 19496627 DOI: 10.2165/0003495-200969080-00003]
- 5 Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109: 143-159 [PMID: 16033329 DOI: 10.1042/CS20050025]
- 6 巫文宏, 印建平. 厄贝沙坦氢氯噻嗪对原发性高血压患者疗效观察及对内皮功能的影响. *实用临床医药杂志* 2010; 14: 43
- 7 Candido R, Allen TJ, Lassila M, Cao Z, Thallas V, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Irbesartan but not amlodipine suppresses diabetes-associated atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: 1536-1542 [PMID: 15023892 DOI: 10.1161/01.CIR.0000124061.78478.94]
- 8 姚东英, 刘菲. 糖尿病胃轻瘫发病机制的研究进展. *国际消化病杂志* 2011; 31: 16-17, 47
- 9 李浩旭, 秦晓民, 鲁彦, 豆兴成. 糖尿病胃轻瘫发病机制. *胃肠病学和肝病杂志* 2003; 12: 88-90
- 10 Kawanabe Y, Nauli SM. Endothelin. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 195-203 [PMID: 20848158 DOI: 10.1007/s00018-010-0518-0]
- 11 张蕾, 阮君山, 严令耕, 郑仕中, 王爱云, 陆茵. 内皮素和一氧化氮致血管损伤性疾病的分子机制及药物研发策略. *中国药理学通报* 2012; 28: 162-164
- 12 Park L, Thornhill J. Hypoxic modulation of striatal lesions induced by administration of endothelin-1. *Brain Res* 2000; 883: 51-59 [PMID: 11063987 DOI: 10.1016/S0006-8993(00)02884-5]
- 13 高雪, 杨洁, 元英进. 盐酸川芎嗪对血管紧张素II损伤内皮细胞的保护作用. *细胞生物学杂志* 2007; 29: 895-900
- 14 de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 415-472 [PMID: 10977869]
- 15 Duff JL, Marrero MB, Paxton WG, Schieffer B, Bernstein KE, Berk BC. Angiotensin II signal transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 511-517 [PMID: 8574999]
- 16 Schiffrin EL, Deng LY. Relationship between small-artery structure and systolic, diastolic and pulse pressure in essential hypertension. *J Hypertens* 1999; 17: 381-387 [PMID: 10100076 DOI: 10.1097/00004872-199917030-00011]
- 17 Laverman GD, Navis G, Henning RH, de Jong PE, de Zeeuw D. Dual renin-angiotensin system blockade at optimal doses for proteinuria. *Kidney Int* 2002; 62: 1020-1025 [PMID: 12164886 DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00536.x]
- 18 Kurtz TW, Pravenec M. Antidiabetic mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists: beyond the renin-angiotensin system. *J Hypertens* 2004; 22: 2253-2261 [PMID: 15614015 DOI: 10.1097/00004872-200412000-00003]
- 19 周泉, 吴大方. 厄贝沙坦对老年代谢综合征患者血管内皮细胞功能的影响. *临床合理用药* 2011; 4: 19-20
- 20 Liu BC, Chen Q, Luo DD, Sun J, Phillips AO, Ruan XZ, Liu NF. Mechanisms of irbesartan in prevention of renal lesion in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 67-73 [PMID: 12511232]
- 21 Zorad S, Dou JT, Benicky J, Hutanu D, Tybitanclova K, Zhou J, Saavedra JM. Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. *Eur J Pharmacol* 2006; 552: 112-122 [PMID: 17064684 DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.08.062]

#### ■同行评价

本文立意新颖, 有一定临床价值.

编辑 田滢 电编 鲁亚静



## $\alpha$ -亚麻酸对转化生长因子 $\beta$ 1诱导的肝星状细胞的影响

王莉娟, 吴金明, 方红龙, 刘 扬, 黄智铭

### ■背景资料

研究表明约1%-5%的非酒精性脂肪肝病(NAFLD)患者最终可发展为肝纤维化及肝硬化, 其中肝星状细胞(HSC)的活化及增殖发挥了重要作用, 若能干扰HSC的活化及增殖, 可能是阻止肝硬化的途径之一。n-3族多不饱和脂肪酸可明显降低细胞中和转录因子(NF- $\kappa$ B)的含量, 可能对已活化的HSC的增殖有一定抑制作用。

王莉娟, 吴金明, 方红龙, 刘扬, 黄智铭, 温州医学院附属第一医院消化内科 浙江省温州市 325000

王莉娟, 硕士, 主要从事肝纤维化的研究。

作者贡献分布: 本研究由吴金明与王莉娟共同设计; 方红龙、刘扬及黄智铭进行指导, 实验由王莉娟完成; 最终数据分析与论文撰写由王莉娟完成; 吴金明审校。

通讯作者: 吴金明, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 325000, 浙江省温州市府学巷2号, 温州医学院附属第一医院消化内科。phdwu0003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-10-12 修回日期: 2013-01-25

接受日期: 2013-03-06 在线出版日期: 2013-03-28

### Effect of ALA treatment on cell proliferation, secretion of types I and III collagen, and $\alpha$ -SMA expression in rat hepatic satellite cells treated with transforming growth factor $\beta$ 1

Li-Juan Wang, Jin-Ming Wu, Hong-Long Fang, Yang Liu, Zhi-Ming Huang

Li-Juan Wang, Jin-Ming Wu, Hong-Long Fang, Yang Liu, Zhi-Ming Huang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Jin-Ming Wu, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, 2 Fuxuexiang, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China. phdwu0003@yahoo.com.cn

Received: 2012-10-12 Revised: 2012-01-25

Accepted: 2013-03-06 Published online: 2013-03-28

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of treatment with  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) on cell proliferation, secretion of types I and III collagen, and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) expression in transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1)-treated rat hepatic satellite cells (HSCs).

**METHODS:** Cultured HSCs were divided into five groups: control group, TGF- $\beta$ 1 group (5 ng/mL) and three TGF- $\beta$ 1 plus LNA groups (treated with TGF- $\beta$ 1 plus 50, 150 or 250 ng/mL of ALA). Cell proliferation was assessed by MTT assay. The levels of types I and III collagen were measured by ELISA. Western blot was used to detect

the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin.

**RESULTS:** TGF- $\beta$ 1 induced cell proliferation and increased the secretion of collagen in HSCs. Compared to the TGF- $\beta$ 1 group, treatment with different doses of ALA inhibited cell proliferation and decreased the secretion of types I and III collagen and expression of  $\alpha$ -SMA (all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Treatment with ALA inhibits TGF- $\beta$ 1-induced cell proliferation, secretion of types I and III collagen, and  $\alpha$ -SMA expression in rat HSCs.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:**  $\alpha$ -linolenic acid; Transforming growth factor- $\beta$ 1; Hepatic satellite cells; Fatty liver fibrosis; Cirrhosis

Wang LJ, Wu JM, Fang HL, Liu Y, Huang ZM. Effect of ALA treatment on cell proliferation, secretion of types I and III collagen, and  $\alpha$ -SMA expression in rat hepatic satellite cells treated with transforming growth factor  $\beta$ 1. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 804-808 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/804.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.804>

### 摘要

**目的:** 探讨 $\alpha$ -亚麻酸( $\alpha$ -linolenic acid, ALA)对转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1)诱导的肝星状细胞(hepatic satellite cell, HSC)增殖及分泌功能的影响。

**方法:** 采用活化的HSC作为研究模型, 将传代的细胞分为5组, 以MTT比色法观察ALA对HSC的增殖效应, 以ELISA检测细胞培养上清液中I型及III型胶原的含量, 以Western blot法检测 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)的表达。

**结果:** TGF- $\beta$ 1能诱导HSC增殖并促进胶原的分泌, ALA可不同程度抑制TGF- $\beta$ 1所诱导的HSC增殖及I、III型胶原和 $\alpha$ -SMA的表达( $P < 0.01$ ), 且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ )。

**结论:** ALA在高浓度时对TGF- $\beta$ 1能诱导的

### ■同行评议者

高泽立, 副教授, 周浦医院消化科, 上海交大医学院九院周浦分院



HSC起抑制作用, 可能对脂肪性肝纤维化及其引起的肝硬化有治疗作用。

© 2013年版权归Baishideng所有.

**关键词:**  $\alpha$ -亚麻酸; 转化生长因子 $\beta$ 1; 肝星状细胞; 脂肪性肝纤维化; 肝硬化

王莉娟, 吴金明, 方红龙, 刘扬, 黄智铭.  $\alpha$ -亚麻酸对转化生长因子 $\beta$ 1诱导的肝星状细胞的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 804-808 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/804.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.804>

## 0 前言

目前非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)越来越引起人们的重视, 研究发现约1%-5%的NAFLD患者最终可发展为肝纤维化及肝硬化<sup>[1]</sup>. 其中肝星状细胞(hepatic satellite cell, HSC)的活化及增殖发挥了重要作用<sup>[1]</sup>. n-3多不饱和脂肪酸有降低血脂、减少炎症细胞因子、减少肝脏丙二酰CoA的量、增强机体免疫功能、对肿瘤的抑制的分泌等生理作用<sup>[2-4]</sup>, 其中以 $\alpha$ -亚麻酸( $\alpha$ -linolenic acid, ALA)为代表, 但其对肝纤维化的影响研究较少. n-3多不饱和脂肪酸也为游离脂肪酸的组成部分, 可能对脂肪性肝纤维化产生一定影响. 另外转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)可通过HSC内的TGF- $\beta$ /Smads信号通路促进纤维化的发生发展, 被认为是调控肝纤维化的核心物质, 用TGF- $\beta$ 1促进增殖可使n-3多不饱和脂肪酸对HSC的作用结果更容易显现. 探讨ALA对TGF- $\beta$ 1所诱导的HSC增殖和活化的影响不仅有助于了解n-3多不饱和脂肪酸在脂肪性肝纤维化及肝硬化中所起的作用, 还对已进展为肝硬化患者的营养能量的补充具有指导意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DMEM培养基及胎牛血清(美国GIBCO公司),  $\alpha$ -亚麻酸(美国Sigma产品), MTT(北京索来宝生物公司), 重组人TGF- $\beta$ 1(美国Pedro Tech公司), 肝星状细胞系HSC2-T6细胞(温州医学院附属第一医院感染内科陈永平教授惠赠), 大鼠I型及III型胶原ELISA试剂盒(美国ADL公司), 大鼠 $\alpha$ -肌动蛋白抗体及内参 $\beta$ -tubulin(美国Santa Cruz公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 HSC培养:** 肝星状细胞系HSC2-T6细胞用

含10%胎牛血清的DMEM培养瓶, 在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养, 计数及观察细胞活性, 以 $1 \times 10^5$ /mL的浓度接种于培养瓶中, 以后每2-3 d换液1次.

**1.2.2 自身配对设计:** 实验分组: A组: 对照组、B组: TGF- $\beta$ 1 5 ng/mL组、C组: TGF- $\beta$ 1 5 ng/mL+ALA 50 mmol/L组、D组: TGF- $\beta$ 1 5 ng/mL+ALA 150 mmol/L组、E组: TGF- $\beta$ 1 5 ng/mL+ALA 250 mmol/L组.

**1.2.3 MTT法检测细胞增殖:** HSC-T6细胞融合成单层后, 取对数生长期细胞, 分别以0.25%胰蛋白酶消化, 并接种至无菌96孔板内, 每次每组4个复孔, 调整细胞接种密度为 $1 \times 10^6$ /mL, 每孔均加入细胞悬液200  $\mu$ L, 置37℃, 5%CO<sub>2</sub>培养箱中, 24 h 96孔板内细胞贴壁后, 吸去原培养液, 按分组加入试剂, 每孔再加入无菌MTT溶液(5 mg/mL), 继续在原条件下孵育4 h, 然后终止培养, 吸去孔内培养液, 每孔加入150  $\mu$ L的DMSA, 微型振荡器振荡10 min, 选择490 nm波长, 在酶标仪上检测各孔的吸光(A)值, 实验重复4次.

**1.2.4 ELISA法检测型I及III型胶原的表达:** 收集做MTT时药物处理后的上清液. 按I型及III型胶原ELISA试剂盒操作说明书操作.

**1.2.5 Western blot法检测 $\alpha$ -SMA的表达:** 各组蛋白标本经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至PVDF膜, 封闭1 h后, 加入 $\alpha$ -肌动蛋白抗体(1:400)和内参 $\beta$ -tubulin抗体(1:500), 一抗过夜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2500)作用1 h, 电化学发光法检测, 在暗室中X光胶片曝光并冲洗显影, 测定各条带的灰度值, 经内参照 $\beta$ -tubulin校正后得到蛋白的相对表达量.

**统计学处理** 数据用mean $\pm$ SD表示, 采用SPSS17.0作One-way ANOVA分析, 两两比较用LSD检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 以MTT法检测HSC细胞增殖** 组间比较 $F = 25.07$ ,  $P < 0.01$ , 差异有统计学意义. LSD法多重比较可以发现ALA对HSC的增殖有抑制作用(B、C、D、E 4组各组间差异有统计学意义,  $P < 0.05$ , A组与E组间差异无统计学意义,  $P > 0.05$ ), 并呈剂量依赖性, A组与E组间无统计学差异可能为ALA对HSC的抑制作用与TGF- $\beta$ 1对HSC的增殖作用相互抵消所致. TGF- $\beta$ 1对HSC的增殖有促进作用(A组与B、C、D组比较,  $P < 0.05$ , 表1, 图1).

### ■研究前沿

据研究n-3族多不饱和脂肪酸有降低血脂、减少炎症细胞因子、减少肝脏丙二酰CoA含量、增强机体免疫功能等生理作用, 但是否对脂肪性肝纤维化及其引起的肝硬化有治疗作用尚不能明确.

### ■相关报道

n-3族多不饱和脂肪酸对脂肪肝及其产生的病理危害可能有一定的治疗的作用, 可能与其在肝病早期即对脂质沉积有一定的抑制作用有关, 推测可能与n-3类脂肪酸能抑制NF- $\kappa$ B及使花生四烯类产物减少有关.

## ■创新盘点

本文利用体外刺激活化的肝星状细胞,结果表明其可抑制活化细胞的增殖及减少胶原分泌等作用,多方面说明其可能用于肝纤维化的治疗。

表 1 ALA对HSC增殖的影响 (mean ± SD)

分组	A值	F值	P值
A组	0.52 ± 0.62 <sup>egi</sup>	25.07	<0.01
B组	1.14 ± 0.16 <sup>agik</sup>		
C组	0.98 ± 0.12 <sup>aeik</sup>		
D组	0.80 ± 0.75 <sup>aegk</sup>		
E组	0.64 ± 0.11 <sup>cegi</sup>		

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>c</sup>*P*>0.05 vs A组; <sup>a</sup>*P*<0.05 vs B组; <sup>a</sup>*P*<0.05 vs C组; <sup>i</sup>*P*<0.05 vs D组; <sup>k</sup>*P*<0.05 vs E组。ALA: α-亚麻酸; HSC: 肝星状细胞。

表 2 ALA对I型、III型胶原蛋白表达的影响

分组	I型胶原	III型胶原
A组	76.94 ± 11.89 <sup>gik</sup>	3.17 ± 0.50 <sup>gik</sup>
B组	159.13 ± 20.30 <sup>beikm</sup>	6.51 ± 0.79 <sup>beikm</sup>
C组	137.29 ± 17.12 <sup>degkm</sup>	5.38 ± 0.57 <sup>degkm</sup>
D组	115.69 ± 16.16 <sup>degim</sup>	4.28 ± 0.4 <sup>degim</sup>
E组	95.86 ± 23.11 <sup>dgik</sup>	4.39 ± 1.00 <sup>dgik</sup>

<sup>b</sup>*P*<0.01 vs A组; <sup>d</sup>*P*<0.01 vs B组; <sup>e</sup>*P*<0.05 vs A组; <sup>g</sup>*P*<0.05 vs B组; <sup>i</sup>*P*<0.05 vs C组; D组与A、B、C、E组比较<sup>k</sup>*P*<0.05; <sup>m</sup>*P*<0.05 vs E组。ALA: α-亚麻酸。

表 3 Western blot检测α-SMA的表达

分组	α-SMA灰度值	F值	P值
A组	34.33 ± 13.65	226.31	<0.01
B组	450.00 ± 18.08		
C组	226.33 ± 23.01		
D组	136.05 ± 15.02		
E组	84.67 ± 15.50		

α-SMA: α-平滑肌肌动蛋白。

2.2 I型及III型胶原蛋白的表达 I型胶原纤维蛋白组间比较, *F* = 19.41, *P*<0.01, 差异有统计学意义; III型胶原纤维蛋白组间比较, *F* = 16.66, *P*<0.01, 差异有统计学意义。抑制作用呈剂量依赖性(*P*<0.05)。LSD法多重比较可以发现TGF-β1可促进HSC分泌I型及III型(*P*<0.01), 而ALA对I型及III型胶原蛋白的分泌均有一定的抑制作用(B、C、D、E 4组各组间差异有统计学意义, *P*<0.05, A组与E组间差异无统计学意义, *P*>0.05, A组与E组间无统计学差异可能为ALA对HSC的抑制作用与TGF-β1对HSC的增殖作用相互抵消所致), 并呈剂量依赖性(*P*<0.05, 表2, 图2, 3)。

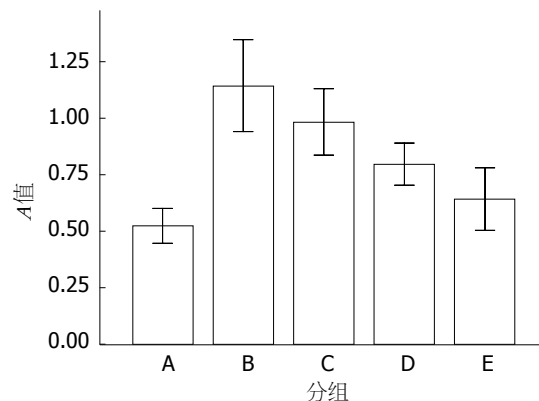


图 1 MTT法检测肝星状细胞增殖。

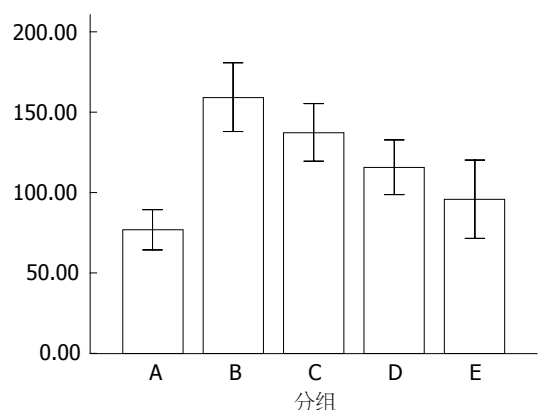


图 2 ELISA法检测I型胶原的表达。

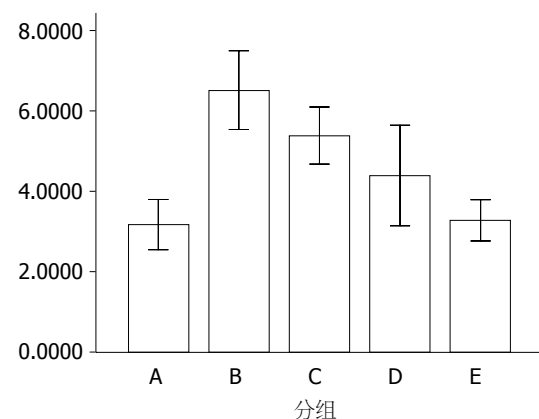
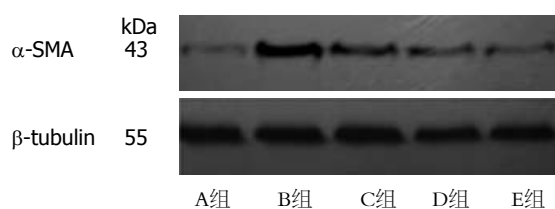


图 3 ELISA法检测III型胶原的表达。

2.3 Western blot检测α-SMA的表达 α-SMA组间比较*F* = 226.31, *P*<0.01, 差异有统计学意义。LSD法检验可以看出TGF-β1能明显促进HSC表达α-SMA(*P*<0.01), 经ALA作用后, TGF-β1诱导的α-SMA表达受到抑制并呈剂量依赖性(*P*<0.05, 表3, 图4)。

## 3 讨论

我们的研究结果可证实ALA对在高浓度时对

图4 Western blot检测 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白的表达。

TGF- $\beta$ 1所诱导的HSC可能起抑制作用,对脂肪性肝纤维化及脂肪性肝硬化可能具有一定治疗作用。TGF- $\beta$ 1所介导的信号通道被认为在HSC的活化及ECM的产生起重要作用<sup>[5]</sup>,本实验也证实TGF- $\beta$ 1可促进HSC的增殖,HSC2-T6肝星状细胞系本身是活化的肝星状细胞系,为使效果更明显,予TGF- $\beta$ 1再激活。

有研究表明多不饱和脂肪酸(n-3及n-3+n-6)可能不能纠正肝纤维化及脂质沉积<sup>[6]</sup>。还有研究发现:n-3族多不饱和脂肪酸对脂肪肝及其产生的病理危害可能有一定的治疗的作用<sup>[7,8]</sup>,可能与其在肝病早期即对脂质沉积有一定的抑制作用有关<sup>[8]</sup>,究其机制,推测可能与n-3类脂肪酸能抑制核转录 $\kappa$ B(nuclear transcription factor, NF- $\kappa$ B)及使花生四烯类产物减少有关<sup>[2,3]</sup>。这提示n-3族多不饱和脂肪酸对脂肪性肝纤维化可能有治疗作用,但对体外HSC的增殖及分泌功能等尚无其他研究成果。因此本实验用MTT法、WB及ELISA法检测ALA对HSC的增殖、活化、分泌功能的影响,讨论n-3族多不饱和脂肪酸对脂肪性肝纤维化的作用。

细胞增殖是HSC活化的重要特征之一。MTT法检测结果显示ALA能一定程度的抑制由TGF- $\beta$ 1诱导的HSC的增殖,并呈浓度依赖性:ALA低浓度时无明显作用;当ALA浓度逐渐升高时可部分抑制HSC的活化,并随着浓度的增高抑制作用增强。

各种原因导致的肝纤维化最后均表现为ECM的增加,星状细胞分泌胶原纤维增加。实验结果提示ALA对HSC分泌胶原纤维有抑制作用,作用随ALA浓度的增加而加强。 $\alpha$ -SMA是HSC活化的标志,活化的HSC表达 $\alpha$ -SMA,表达 $\alpha$ -SMA的多少可一定程度反映HSC的活化程度。高浓度的ALA可使HSC的 $\alpha$ -SMA表达减少,低浓度时作用不明显,说明高浓度时可抑制HSC的活化。

HSC的活化和增殖在脂肪性肝纤维化和肝硬化的发生发展起重要作用。近年来非酒精性

脂肪性肝病发病机制逐渐明确,其中二次打击学说已被普遍认可,以胰岛素抵抗为主的代谢综合征起重要作用<sup>[9]</sup>。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、TGF- $\beta$ 、IGF-1等细胞因子刺激并激活HSC,表达 $\alpha$ -SMA活化后以分泌以I型及III型胶原为主的细胞外基质<sup>[10]</sup>。已有研究表明:n-3多不饱和脂肪酸的可改善肝脂代谢,能提高肝脏代谢关键酶脂蛋白酶的LDL受体的活性,减少肝内甘油三酯的合成,有直接降脂作用。

NF- $\kappa$ B是由作为转录因子的Rel家族组成的同二聚体或异二聚体。NF- $\kappa$ B可阻止TNF- $\alpha$ 所诱导的HSC的凋亡<sup>[11]</sup>。NF- $\kappa$ B的缺失可对活化的HSC凋亡起一定的作用<sup>[12]</sup>,而n-3族多不饱和脂肪酸可明显降低细胞中NF- $\kappa$ B的含量<sup>[3]</sup>,可能与其抑制已活化的HSC的增殖有关。

n-3族多不饱和脂肪酸还能降低细胞膜n-6族不饱和脂肪酸的含量,从而降低n-6族不饱和脂肪酸代谢产物花生四烯类产物等炎症物质的产生<sup>[2]</sup>,减少对HSC的刺激也可能是n-3族多不饱和脂肪酸对HSC起作用的途径之一。综上所述,n-3族多不饱和脂肪酸可能通过多种途径对HSC的增殖起抑制作用,可能对脂肪性肝纤维化及其引起的肝硬化有治疗作用。

## 4 参考文献

- 1 Ji G, Zhao X, Leng L, Liu P, Jiang Z. Comparison of dietary control and atorvastatin on high fat diet induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in rats. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 23 [PMID: 21269482 DOI: 10.1186/1476-511X-10-23.]
- 2 Norris JM, Yin X, Lamb MM, Barriga K, Seifert J, Hoffman M, Orton HD, Barón AE, Clare-Salzler M, Chase HP, Szabo NJ, Erlich H, Eisenbarth GS, Rewers M. Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. *JAMA* 2007; 298: 1420-1428 [PMID: 17895458]
- 3 Hardman WE. Omega-3 fatty acids to augment cancer therapy. *J Nutr* 2002; 132: 3508S-3512S [PMID: 12421878]
- 4 Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* (Maywood) 2008; 233: 674-688 [PMID: 18408140 DOI: 10.3181/0711-MR-311.]
- 5 Zhao L, Gandhi CR, Gao ZH. Involvement of cytosolic phospholipase A2 alpha signalling pathway in spontaneous and transforming growth factor-beta-induced activation of rat hepatic stellate cells. *Liver Int* 2011; 31: 1565-1573 [PMID: 22093332 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02632.x.]
- 6 Fernández I, Fontana L, Gil A, Ríos C, Torres MI. Dietary supplementation with monounsaturated

**应用要点**  
ALA可抑制HSC的增殖及分泌,为治疗脂肪性肝纤维化及其所引起的肝硬化提供新的途径。



## ■同行评价

本文设计合理, 实验方法可信, 统计方法运用合理, 参考文献较新, 值得基础研究者和广大临床医生阅读。

- and long-chain polyunsaturated fatty acids influences the liver structural recovery and hepatocyte binuclearity in female Wistar rats in experimental cirrhosis induced by thioacetamide. *Exp Toxicol Pathol* 2005; 57: 65-75 [PMID: 16089321]
- 7 Spadaro L, Magliocco O, Spampinato D, Piro S, Oliveri C, Alagona C, Papa G, Rabuazzo AM, Purrello F. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis* 2008; 40: 194-199 [PMID: 18054848]
- 8 González-Pérez A, Horrillo R, Ferré N, Gronert K, Dong B, Morán-Salvador E, Titos E, Martínez-Clemente M, López-Parra M, Arroyo V, Clària J. Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J* 2009; 23: 1946-1957 [PMID: 19211925 DOI: 10.1096/fj.08-125674.]
- 9 Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Castella L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761-1772 [PMID: 17456850 DOI: 10.2337/db06-1491]
- 10 Yamamoto M, Sumiyoshi H, Nakagami K, Tahara E. Distribution of collagen types I, III, and V in fibrotic and neoplastic human liver. *Acta Pathol Jpn* 1984; 34: 77-86 [PMID: 6328863]
- 11 Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, Brenner DA, Rippe RA. Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2000; 33: 49-58 [PMID: 10905586]
- 12 Son G, Iimuro Y, Seki E, Hirano T, Kaneda Y, Fujimoto J. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293: G631-G639 [PMID: 17640975]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



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

## • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》 (2011年版)

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

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

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

# SCF/c-Kit信号通路在“泻剂结肠”发病机制中的作用

霍明东, 丁曙晴, 丁义江, 江滨, 张波

霍明东, 张波, 南京中医药大学 江苏省南京市 210046  
丁曙晴, 丁义江, 江滨, 南京中医药大学第三附属医院 江苏省南京市 210001  
霍明东, 博士研究生, 主要从事肛肠动力学的研究。  
南京市卫生局重点基金资助项目, No. ZKX11004  
江苏省中医药局科技基金资助项目, No. LZ11105  
作者贡献分布: 此课题由丁义江与丁曙晴设计; 研究过程由霍明东、江滨及张波操作完成; 数据分析由霍明东完成; 论文写作由霍明东完成。  
通讯作者: 丁义江, 教授, 210001, 江苏省南京市金陵路1号, 南京中医药大学第三附属医院。njgczx@gmail.com  
电话: 025-83285156  
收稿日期: 2013-02-04 修回日期: 2013-03-05  
接受日期: 2013-03-16 在线出版日期: 2013-03-28

## Role of SCF/c-Kit signaling pathway in the pathogenesis of cathartic colon

Ming-Dong Huo, Shu-Qing Ding, Yi-Jiang Ding, Bin Jiang, Bo Zhang

Ming-Dong Huo, Bo Zhang, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu Province, China  
Shu-Qing Ding, Yi-Jiang Ding, Bin Jiang, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China  
Supported by: the Key Fund of Nanjing Municipal Health Bureau, No. ZKX11004; and the Foundation of Jiangsu Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine, No. LZ11105  
Correspondence to: Yi-Jiang Ding, Professor, the Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, 1 Jinling Road, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China. njgczx@gmail.com  
Received: 2013-02-04 Revised: 2013-03-05  
Accepted: 2013-03-16 Published online: 2013-03-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of SCF/c-Kit signaling pathway in the pathogenesis of cathartic colon.

**METHODS:** Thirty-six healthy adult SD rats were randomly divided into three groups (12 rats per group): control group, model group, and recovery group. The control group was given normal saline by gavage, and the model group and recovery group were given rhein suspension by gavage to induce cathartic colon. Specimens were taken immediately after modeling in the model group and 30 days after model-

ing in the recovery group. The intestinal transit function was assessed in each rats of each group by detecting the first melena discharge time. RT-PCR and Western blot were used to detect SCF/c-Kit mRNA and protein expression levels in colon tissue.

**RESULTS:** Compared to the control group, the first melena discharge time was significantly prolonged in the model group ( $491.5 \pm 40.2$  vs  $373.4 \pm 46.5$ ,  $P < 0.01$ ); however, there was no significant difference in the first melena discharge time between the model group and recovery group ( $477.9 \pm 39.6$  vs  $491.5 \pm 40.2$ ,  $P > 0.05$ ). Compared to the control group, c-Kit and SCF mRNA and protein expression levels were significantly decreased in both the model group and recovery group (all  $P < 0.01$ ); however, there were no significant differences in c-Kit and SCF mRNA and protein expression levels between the model group and recovery group (both  $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Reduced colonic motility in rats with cathartic colon may be associated with down-regulation of SCF/c-Kit signaling in colon tissue.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Stimulant laxative; Cathartic colon; Rhein; c-Kit; Stem cell factor

Huo MD, Ding SQ, Ding YJ, Jiang B, Zhang B. Role of SCF/c-Kit signaling pathway in the pathogenesis of cathartic colon. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 809-813 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/809.asp>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.809>

## 摘要

**目的:** 探讨SCF/c-Kit信号通路在“泻剂结肠”发病机制中的作用。

**方法:** 健康成年SD大鼠36只, 随机分为对照组(12只)、模型组(12只)和模型恢复组(12只)。对照组大鼠生理盐水灌胃, 模型组和模型恢复组大鼠采用“大黄酸混悬液灌胃法”制作

## ■背景资料

便秘是临床常见病与多发病, 随着生活节奏的加快, 饮食结构的改变, 精神和社会因素的影响, 其发病率逐年上升。我国患病率约为10%-15%。“泻剂结肠”是慢传输型便秘的重要临床类型, 目前尚无有效的治疗药物, 其发病机制的研究已经越来越引起人们的重视。

## ■同行评议者

赵铁建, 教授, 广西中医药大学基础医学院生理学教研室; 侯凤刚, 副主任医师, 副教授, 上海中医药大学附属市中医院肿瘤科; 郑培永, 副教授, 上海中医药大学脾胃病研究所, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科

## ■研发前沿

ICC对胃肠动力的重要调控作用是近年来关于胃肠动力研究的突破性进展,有关ICC的调控机制是当今乃至今后的研究热点。

“泻剂结肠”动物模型。模型组造模结束后取材,模型恢复组造模结束正常饲养30 d后取材。各组大鼠处死前观察首粒黑便排出时间以检测肠道传输功能。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot技术分别检测各组大鼠结肠组织中c-Kit和SCF的mRNA水平和蛋白水平表达。

**结果:**模型组大鼠首粒黑便排出时间明显延长,与对照组差别显著( $491.5 \pm 40.2$  vs  $373.4 \pm 46.5$ ,  $P < 0.01$ );模型恢复组与模型组相比,首粒黑便排出时间没有统计学差异( $477.9 \pm 39.6$  vs  $491.5 \pm 40.2$ ,  $P > 0.05$ )。与对照组相比,模型组及模型恢复组的c-Kit和SCF的mRNA水平和蛋白水平表达均明显减弱( $P < 0.01$ ),而模型恢复组与模型组相比,c-Kit和SCF的mRNA水平和蛋白水平表达无明显差异( $P > 0.05$ )。

**结论:**“泻剂结肠”的结肠动力减退可能与结肠组织中SCF/c-Kit信号通路的表达下调有关。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 刺激性泻剂; 泻剂结肠; 大黄酸; c-Kit; 慢传输型便秘

霍明东, 丁曙晴, 丁义江, 江滨, 张波. SCF/c-Kit信号通路在“泻剂结肠”发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 809-813 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/809.asp>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.809>

## 0 引言

慢传输型便秘(slow transit constipation, STC)是临床上常见的一类以结肠动力减弱为主要特点的顽固性便秘。该病病因不清,症状顽固,常诱发急性心肌梗塞、脑血管意外,危机患者生命<sup>[1]</sup>。STC患者往往长期服用番泻叶、大黄等刺激性泻剂,依赖泻剂排便,剂量越用越大而效果越来越差,不服泻剂不排便,形成“泻剂结肠”。目前,“泻剂结肠”的发病机制尚不清楚,尚无有效的治疗方法。Cajal间质细胞(Interstitial cells of cajal, ICC)是胃肠道起搏细胞,介导神经递质的产生和作用,ICC异常可导致胃肠动力障碍<sup>[2,3]</sup>。ICC特异性表达酪氨酸激酶受体c-Kit, c-Kit与其配体干细胞因子(stem cell factor, SCF)组成的SCF/c-Kit信号通路已被证实对ICC具有重要调控作用<sup>[4,5]</sup>。SCF/c-Kit信号通路在“泻剂结肠”发病机制中的作用尚不清楚。本研究中,我们通过给予大鼠大黄酸灌胃建立“泻剂结肠”动物

模型,观察停用泻剂后,肠动力能否恢复,并探讨SCF/c-Kit信号通路在“泻剂结肠”发病机制中的作用,为“泻剂结肠”的防治提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年SD大鼠36只,雌雄各半,体重180-220 g,由东南大学医学院实验动物中心提供。大黄酸(南京泽朗医药科技有限公司)。2%大黄酸混悬液:每100 mL生理盐水加入大黄酸2 g。3%戊巴比妥钠溶液:每40 mL生理盐水加入戊巴比妥钠1.2 g。逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自大连TAKARA公司。BCA蛋白浓度测定试剂盒和SDS-PAGE凝胶配置试剂盒购自北京碧云天生物技术有限公司。兔来源GAPDH和c-Kit、SCF多克隆一抗及羊抗兔HRP二抗均购自美国Santa Cruz公司。ECL发光液购自北京博奥森生物技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 “泻剂结肠”大鼠模型的建立:**参照文献[6,7]并加以改进,24只大鼠应用“大黄酸混悬液灌胃法”制作大鼠“泻剂结肠”动物模型。造模时间共110 d,经历3个循环。第1循环隔日灌胃,1.2 mL/(100 g/次)(即每次每100 g大鼠用1.2 mL大黄酸混悬液灌胃);第2循环灌胃5 d停2 d,1.2 mL/(100 g/次);第3循环灌胃5 d停2 d,1.6 mL/(100 g/次)。每个循环结束以80%的大鼠稀便消失为标准。

**1.2.2 分组:**36只大鼠随机分为:(1)模型组:12只大鼠,造模结束后取材;(2)模型恢复组:12只大鼠,造模结束正常饲养30 d后取材;(3)对照组:12只大鼠,生理盐水灌胃,生理盐水灌胃频率及用量同模型组,与模型组同时取材。

**1.2.3 首粒黑便排出时间的检测:**各组大鼠处死前均停止灌胃1 wk后,以10%活性炭悬液3 mL灌胃,记录从灌胃到首粒黑便排出的时间以反映肠道传输功能。

**1.2.4 取材:**3%戊巴比妥钠1 mL/kg腹腔注射麻醉大鼠,固定,消毒,铺无菌孔巾。取腹部正中切口约3.0 cm切开腹壁各层,观察腹腔内情况。取中段结肠组织两块,迅速投入-180 °C液氮罐中,5 h后转移到-70 °C冰箱冻存,待RT-PCR和Western blot检测。

**1.2.5 RT-PCR法检测大鼠结肠组织c-Kit和SCF mRNA表达:**总RNA的提取按照异硫氰酸胍法,稍作改进。简而言之,将组织研碎、置于异硫氰

## ■相关报道

已有研究表明,SCF/c-Kit信号通路对ICC的发育、分化及表型维持至关重要,但SCF/c-Kit信号通路在“泻剂结肠”发病机制中的作用尚未阐明。



酸胍裂解液, 裂解后依次以酚、氯仿、异丁醇抽提, 加入醋酸钠, 在-20℃冷异丙醇中沉淀1次, 而后溶于不含RNA酶的水中, -80℃冰箱保存. 上述RNA经过DNA酶处理后, 总RNA被逆转录成cDNA, 逆转录所得cDNA在-20℃保存. 引物由英骏公司合成, 序列如下: c-Kit(798 bp)的上游引物为: 5'-AGACCGAACGCAACTT-3', 下游引物为: 5'-GGTGCCATCCACTTCA-3'; SCF(756 bp)上游引物: 5'-AAACTGGTGGCGAATC-3', 下游引物: 5'-CACGGGTAGCAAGAAC-3'; GAPDH(609 bp)基因被用作管家基因, 以衡量加样的一致性. GAPDH的上游引物为: 5'-GC-CAGCCTCGTCTCA-3', 下游引物为: 下游引物: 5'-CACGCCACAGCTTTCC-3'. PCR反应条件: 94℃预变性4 min, 94℃变性30 s, 56℃(退火温度根据不同引物条件而定)退火30 s, 72℃延伸90 s, 共25个循环, 之后72℃延伸7 min. PCR产物鉴定: 配制1.7%的琼脂糖凝胶, 加入浓度0.5 μg/mL的溴化乙锭(EB), 每个样本取5 μL PCR产物和2 μL GAPDH PCR产物与2 μL 6×Loading Buffer上样缓冲液混合均匀加入至同一加样孔, 以0.5×TBE为缓冲液, 电压80 V, 电泳约20 min. 上海复日公司Smartview 2001图像分析处理系统对电泳区带进行光密度扫描制片.

1.2.6 Western blot法检测结肠组织中c-Kit及SCF的含量: 200 mg组织经研磨粉碎, 加入1 000 μL新鲜配制的、冷的蛋白裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1%SDS, 每10 mL加入一片蛋白酶抑制剂), 充分裂解后, 裂解液经4℃、14 000 r/min离心10 min, 上清液经BSA蛋白试剂盒测定总蛋白浓度后进行Western blot分析. 取40 μg蛋白与上样缓冲液混合, 煮沸5 min, 置于12%SDS变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后半干电转移法转移至PVDF膜, 室温下1%BSA封闭1h. 加入稀释度1:1 000的羊抗大鼠多克隆抗体(Santa Cruz 公司)4℃孵育过夜, 第2天用羊抗兔二抗(1:5 000稀释)室温孵育1 h. TBST洗膜, 化学发光法显色, X线底片曝光. GAPDH作为内参照, 实验重复3次.

**统计学处理** 采用SAS软件对数据进行统计学分析, 各组数据以mean±SD表示, 组间比较采用单因素方差分析, 包括正态分布检验和方差齐性分析, 如果不符合正态分布改用非参数检验分析.  $P<0.05$ 被认为有显著性差异.

## 2 结果

2.1 各组大鼠首粒黑便排出时间 模型组大鼠首粒黑便排出时间明显延长, 与对照组相比差别显著, 有统计学意义( $491.5\pm40.2$  vs  $373.4\pm46.5$ ,  $P<0.01$ ). 而模型恢复组大鼠与模型组相比, 首粒黑便排出时间没有统计学差异( $477.9\pm39.6$  vs  $491.5\pm40.2$ ,  $P>0.05$ ).

2.2 结肠组织c-Kit和SCF mRNA水平RT-PCR检测 模型组和对照组结肠组织中c-Kit和SCF mRNA表达结果见图1. 在结肠组织中, c-Kit(798 bp)、SCF(756 bp)和GAPDH(609 bp)都得到了有效扩增, 各个标本中GAPDH基因的扩增基本一致, 证实各样本的加样基本均衡. 模型组c-Kit和SCF的mRNA表达较弱, 与对照组相比, 差别显著( $P<0.01$ ).

2.3 结肠组织c-Kit和SCF的蛋白表达水平Western blot检测 提取各组结肠组织的蛋白作Western blot分析, 比较c-Kit和SCF的蛋白表达(图2). 结果表明, 对照组有较强的c-Kit及SCF蛋白表达. 与对照组相比, 模型组及模型恢复组的c-Kit及SCF蛋白表达明显减弱( $P<0.01$ ), 而模型恢复组与模型组相比, c-Kit及SCF蛋白表达均无明显差异( $P>0.05$ ).

## 3 讨论

“泻剂结肠”是STC的一种重要临床类型, 患者长期服用刺激性泻剂如大黄、番泻叶等, 便秘症状逐渐加重, 结肠动力进行性减退, 到后期多是依靠大剂量泻剂维持排便, 最终导致“泻剂结肠”. 结肠动力减退和依赖泻剂排便是“泻剂结肠”的主要特点. 目前, “泻剂结肠”的发病机制尚不清楚, 治疗难度很大, 临床上多以对症治疗为主, 停药后症状改善不明显, 部分患者最终须行结肠切除术等毁损性治疗措施, 但治疗效果常不理想, 因此建立“泻剂结肠”动物模型进行结肠动力减退机制的研究对于“泻剂结肠”的防治具有极其重要的意义.

大黄酸是从中药大黄中提取的单体, 化学名“1,8-二羟基-3-羧基蒽醌”, 为大黄泻下作用的主要有效成分. 本实验中, 我们采用“大黄酸混悬液灌胃法”制作大鼠“泻剂结肠”动物模型, 结果显示, 模型组大鼠肠道传输时间明显延长, 与对照组相比差别显著( $P<0.01$ ), “泻剂结肠”模型成功建立, 同时也提示, 刺激性泻剂可使肠动力减退, 损伤肠道传输功能. 那么, “泻剂结肠”大鼠停用刺激性泻剂后, 肠道传输功能能

### ■创新盘点

本研究通过“大黄酸混悬液灌胃法”制作“泻剂结肠”动物模型, 探讨SCF/c-Kit信号通路在“泻剂结肠”发病机制中的作用, 为“泻剂结肠”的防治提供理论依据.

## ■应用要点

本研究表明, 刺激性泻剂的长期使用引起结肠组织中SCF/c-Kit信号通路的异常改变参与了“泻剂结肠”的发病机制, 对临床“泻剂结肠”的治疗及刺激性泻剂的使用有一定指导意义。

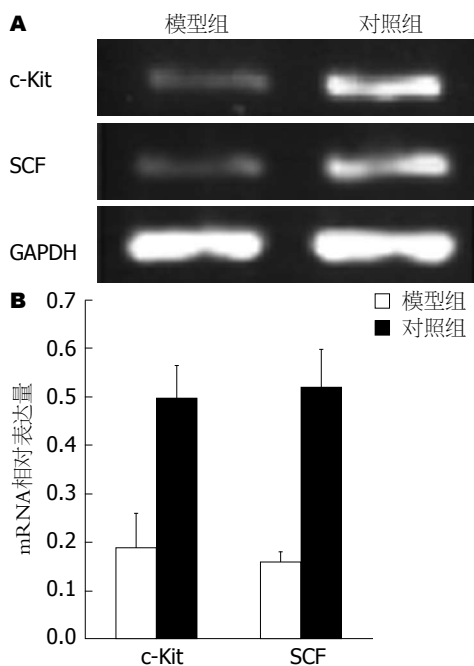


图1 对照组和模型组中c-Kit和SCF mRNA水平表达的差异。

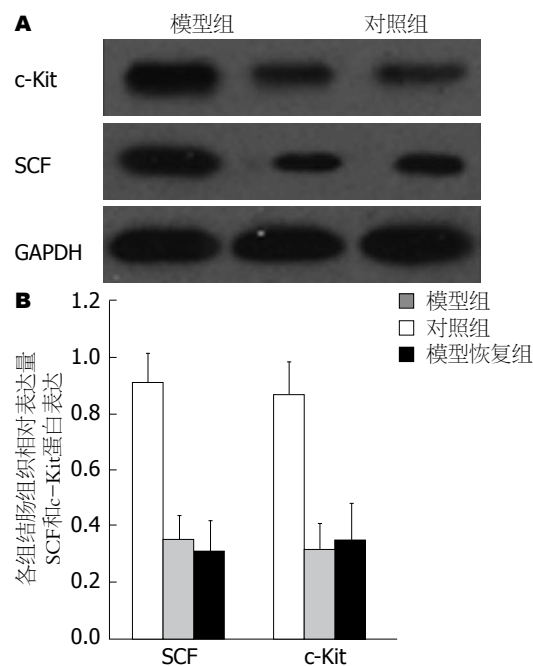


图2 各组结肠组织c-Kit和SCF的蛋白表达。

否改善? 本实验中, 模型恢复组大鼠经停用刺激性泻剂30 d后, 与模型组相比, 首粒黑便排出时间未见明显改善( $P>0.05$ )。

肠神经系统主要指消化道壁内由大量神经元所构成的巨大神经网络, 包括黏膜下丛、深肌丛及肌间神经丛等, 感知、启动和调控胃肠的运动和分泌功能, 其作用可不依赖中枢神经系统的调控。ICC是介于肠神经系统和平滑肌细胞之间的一类极其特殊的间质细胞, 是胃肠道慢波的起搏细胞, 对肠神经信号传递到效应器平滑肌细胞起重要的调控作用<sup>[8,9]</sup>。研究发现, STC患者肠道ICC数量减少, 不规则的慢波形成, 结肠传输减慢, 但ICC的减少是疾病进程中的因还是果仍难以确定<sup>[10,11]</sup>。酪胺酸激酶受体c-Kit是ICC的特异性标志物, SCF是c-Kit的天然配体, SCF与c-Kit结合后所启动的信号通路, 对ICC的增殖、分化及表型维持至关重要<sup>[12,13]</sup>。编码c-Kit的小鼠w位点突变及编码干细胞因子的sl位点突变均可导致胃肠道肌间丛ICC缺失, 肠慢波消失<sup>[14]</sup>。林琳等<sup>[15]</sup>利用吗啡诱导STC小鼠模型, 发现结肠组织ICC数量减少, c-Kit蛋白和c-Kit mRNA表达均减少。Brading等<sup>[16]</sup>研究发现微环境中SCF浓度对ICC的培养至关重要, ICC的培养必须依赖SCF才能成活, 不加SCF的培养基ICC基本不能存活。这些研究结果说明正常的SCF/c-Kit信号通路对ICC的表型维持和生理功能的实现具有不可替代的作用, 而c-Kit和SCF基因的正常表

达是维持这一信号通路的必要条件。

我们通过RT-PCR法来观察对照组和模型组中c-Kit和SCF的mRNA水平表达的差异, 研究发现, 与对照组相比, 模型组c-Kit和SCF的mRNA水平表达均明显降低( $P<0.01$ )。同时, 我们通过Western blot技术检测结肠组织中c-Kit和SCF的蛋白表达水平, 结果显示, 模型组c-Kit和SCF的蛋白表达水平也明显降低( $P<0.01$ )。据此可以推测, 刺激性泻剂的长期使用可引起结肠组织中c-Kit和SCF的mRNA和蛋白水平表达的下调, 破坏了正常的SCF/c-Kit信号通路, 进而引起ICC细胞的异常改变, 导致结肠动力减退, 最终形成“泻剂结肠”。本研究还观察了模型恢复组的SCF/c-Kit信号通路情况, 发现与模型组相比, 模型恢复组的c-Kit和SCF的蛋白表达水平均无明显改善( $P>0.05$ ), 由此我们推测, 停用泻剂30 d后, SCF/c-Kit信号通路不能恢复正常是“泻剂结肠”大鼠肠道传输功能未见明显改善的重要原因。因此, 如何能修复SCF/c-Kit信号传导通路, 促进ICC增殖和修复, 从而改善“泻剂结肠”的结肠动力, 值得进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 El-Salhy M. Chronic idiopathic slow transit constipation: pathophysiology and management. *Colorectal Dis* 2003; 5: 288-296 [PMID: 12814404]
- 2 Davidson RA, McCloskey KD. Morphology and localization of interstitial cells in the guinea pig bladder: structural relationships with smooth muscle

- and neurons. *J Urol* 2005; 173: 1385-1390 [PMID: 15758810 DOI: 10.1097/01.ju.0000146272.80848.37]
- 3 Biers SM, Reynard JM, Doore T, Brading AF. The functional effects of a c-kit tyrosine inhibitor on guinea-pig and human detrusor. *BJU Int* 2006; 97: 612-616 [PMID: 16469036 DOI: 10.1111/j.1464-410X.2005.05988.x]
- 4 Horváth VJ, Vittal H, Lörincz A, Chen H, Almeida-Porada G, Redelman D, Ordög T. Reduced stem cell factor links smooth myopathy and loss of interstitial cells of cajal in murine diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 2006; 130: 759-770 [PMID: 16530517 DOI: 10.1053/j.gastro.2005.12.027]
- 5 贾后军, 童卫东, 刘宝华. 胃肠道Cajal间质细胞与干细胞因子/c-kit信号途径关系. *医学研究生学报* 2010; 23: 192-195
- 6 巫全胜, 吴曙光, 赵菊花, 郭科男, 董小君, 钱宁. 大鼠药物依赖性便秘模型的制作. *实验动物科学* 2007; 24: 70-72
- 7 郑晨果, 金纯, 金定国. 大鼠泻剂结肠模型的再探讨. *浙江中西医结合杂志* 2006; 26: 687-655
- 8 Sanders KM, Ward SM. Interstitial cells of Cajal: a new perspective on smooth muscle function. *J Physiol* 2006; 576: 721-726 [PMID: 16873406 DOI: 10.1113/jphysiol.2006.115279]
- 9 Streutker CJ, Huizinga JD, Driman DK, Riddell RH. Interstitial cells of Cajal in health and disease. Part I: normal ICC structure and function with associated motility disorders. *Histopathology* 2007; 50: 176-189 [PMID: 17222246 DOI: 10.1111/j.1365-2559.2006.02493.x]
- 10 Farrugia G. Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20 Suppl 1: 54-63 [PMID: 18402642 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2008.01109.x]
- 11 Lee JI, Park H, Kamm MA, Talbot IC. Decreased density of interstitial cells of Cajal and neuronal cells in patients with slow-transit constipation and acquired megacolon. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1292-1298 [PMID: 16048580 DOI: 10.1111/j.1400-1746.2005.03809.x]
- 12 Li J, Goodyer CG, Fellows F, Wang R. Stem cell factor/c-Kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 961-972 [PMID: 16213778 DOI: 10.1016/j.biocel.2005.08.014]
- 13 Bashamboo A, Taylor AH, Samuel K, Panthier JJ, Whetton AD, Forrester LM. The survival of differentiating embryonic stem cells is dependent on the SCF-KIT pathway. *J Cell Sci* 2006; 119: 3039-3046 [PMID: 16820414 DOI: 10.1242/jcs.03038]
- 14 Seki K, Komuro T. Distribution of interstitial cells of Cajal and gap junction protein, Cx 43 in the stomach of wild-type and W/Wv mutant mice. *Anat Embryol (Berl)* 2002; 206: 57-65 [PMID: 12478368 DOI: 10.1007/s00429-002-0279-0]
- 15 林琳, 姜柳琴, 张红杰, 胡晔东, 林征, 黄峻. 慢传输运动小鼠结肠组织中Cajal间质细胞的改变. *胃肠病学* 2006; 11: 462-467
- 16 Brading AF, McCloskey KD. Mechanisms of Disease: specialized interstitial cells of the urinary tract--an assessment of current knowledge. *Nat Clin Pract Urol* 2005; 2: 546-554 [PMID: 16474598 DOI: 10.1038/ncpuro0340]

#### ■同行评价

本文以大黄酸复制“泻剂结肠”动物模型, 探讨SCF/c-Kit信号通路在“泻剂结肠”发病机制中的作用, 有一定的创新性。

编辑 李军亮 电编 鲁亚静



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

#### • 消息 •

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

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



# 重组腺相关病毒介导的RNA干扰对乙型肝炎病毒复制和表达的影响

付冰峰, 李绍祥, 宁守斌

## ■背景资料

慢性乙型肝炎病毒感染可继发肝硬化、肝细胞癌, 目前全球每年因HBV感染相关的终末期肝病而死亡的人数多达100万, 是一个严重的公共卫生问题。核苷(酸)类似物和干扰素 $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )是目前全球公认有效的抗HBV药物, 但临床研究发现, 二者在使用过程中存在着应答率有限、停药后易反复等诸多问题, 而且干扰素治疗容易产生干扰素样反应, 核苷类药物易引起病毒变异继而耐药。因此, 寻找一种新的治疗HBV感染的方法势在必行。

## ■同行评议者

杨江华, 副教授, 皖南医学院弋矶山医院感染科; 张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心(肝脏病学, 传染病学)

付冰峰, 河北北方学院 河北省张家口市 075000  
李绍祥, 中国人民解放军北京军区总医院全军肝病治疗中心 北京市 100700  
宁守斌, 中国人民解放军空军总医院消化科 北京市 100142  
付冰峰, 硕士, 主要从事乙型肝炎相关的基础研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30872353  
北京军区十一五计划基金资助项目, No. 06BJ020  
作者贡献分布: 此课题设计由李绍祥完成; 付冰峰完成实验主要内容, 并归纳整理; 宁守斌负责信息采集。  
通讯作者: 李绍祥, 副主任医师, 100700, 北京市东城区东四十条南门仓5号, 中国人民解放军北京军区总医院全军肝病治疗中心。shxili@163.com  
收稿日期: 2013-01-16 修回日期: 2013-02-16  
接受日期: 2013-03-05 在线出版日期: 2013-03-28

## Effect of recombinant adenovirus-associated virus-mediated RNA interference on HBV replication and expression

Bing-Feng Fu, Shao-Xiang Li, Shou-Bin Ning

Bing-Feng Fu, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China  
Shao-Xiang Li, Institute of Liver Disease, Beijing Military General Hospital, Beijing 100700, China  
Shou-Bin Ning, Department of Gastroenterology, Air Force General Hospital of PLA, Beijing 100142, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30872353; and the Project of Beijing Military Region during the "11th Five-year Plan" Period, No. 06BJ020  
Correspondence to: Shao-Xiang Li, Associate Chief Physician, Institute of Liver Disease, Beijing Military General Hospital, 5 Dongsishitiao Nanmencang, Beijing 100700, China. shxili@163.com  
Received: 2013-01-16 Revised: 2013-02-16  
Accepted: 2013-03-05 Published online: 2013-03-28

## Abstract

**AIM:** To observe the effect of recombinant adenovirus-associated virus (rAAV)-mediated RNA interference on HBV replication and expression in HepG2.2.15 cells.

**METHODS:** The expression box of hu6-shRNA was placed between two ITRs of AAV and then ligated to the basic core promoter (BCP) of HBV and BCP-driven Rep gene of AAV, which resulted in rAAV. The rAAV was transfected into HepG2.2.15 cells (HCC cells in which the HBV

gene was inserted). The expression of HBsAg and HBeAg and replication of HBV-DNA in cultured supernatant were determined on days 1, 2, 3 and 10 after transfection, and the AAVS1 region was sequenced on day 3 after transfection.

**RESULTS:** The target sequence-containing vectors PLRBR322-324, PLRBR522-324, PLRBR322-2424 and PLRBR522-2424 were successfully constructed. All the four vectors had inhibitory effects on the expression of HBsAg and HBeAg and on HBV-DNA replication, with the former two (PLRBR322-324 and PLRBR522-324) having more significant inhibitory effect on HBsAg expression, the latter two on HBeAg expression and the third on HBV-DNA replication. The inhibitory effects on HBsAg and HBeAg expression and HBV-DNA replication were most obvious on day 3 after transfection, and the inhibition rate remained high on day 10. Site-directed integration of the target sequence was located in the AAVS1 region.

**CONCLUSION:** The rAAV constructed by several elements of AAV and HBV, together with the help of site-directed integration mediated by Rep protein, is a good exploration to solve the problem of short-term effect of RNAi against HBV.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** RNA interference; ShRNA; Recombinant adenovirus-associated virus; HepG2.2.15 cells; Site-directed integration

Fu BF, Li SX, Ning SB. Effect of recombinant adenovirus-associated virus-mediated RNA interference on HBV replication and expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 814-819 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/814.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.814>

## 摘要

**目的:** 观察以重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)介导的RNA干扰

(RNA interference, RNAi)对HepG2.2.15细胞中乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)复制和表达的影响。

**方法:** 将hu6驱动的shRNA表达框置于腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)的2个ITR(inverted terminal repeat, ITR)之间, 之后接有HBV的基本核心启动子(basic core promoter, BCP)及其驱动的AAV的Rep基因, 构成rAAV, 作为抗HBV的shRNA表达框的质粒载体, 转染HepG2.2.15细胞(肝细胞性肝癌细胞插入乙型肝炎病毒基因), 测定上清液中第1天、第2天、第3天及第10天HBsAg、HBeAg表达及HBV DNA拷贝数, 并对细胞基因组AAVS1区域进行测序。

**结果:** 成功构建了含目的序列的rAAV质粒载体PLRBR322-324、PLRBR522-324、PLRBR322-2424、PLRBR522-2424。体外质粒转染细胞实验显示4个载体对HBsAg、HBeAg表达及HBV DNA复制均有抑制效应, 且前两者对HBsAg高一些、后两者对HBeAg高一些, 第3个对HBV DNA拷贝数高一些。转染后第3天后抑制效应最明显, 第10天抑制率仍较高。针对细胞基因组AAVS1区域测序结果显示, 目的序列定点整合于该区域。

**结论:** 利用AAV和HBV各种元件构建的rAAV, 作为抗HBV的shRNA表达框的载体, 借助Rep蛋白介导的定点整合作用, 为解决RNAi抗HBV作用时间短暂的问题做了一些技术上的探索。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** RNA干扰; 短发夹RNA; rAAV; HepG2.2.15细胞; 定点整合

付冰峰, 李绍祥, 宁守斌. 重组腺相关病毒介导的RNA干扰对乙型肝炎病毒复制和表达的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 814-819 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/814.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.814>

## 0 引言

慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染与肝硬化、肝细胞癌密切相关<sup>[1]</sup>, 目前全球每年因HBV感染相关的终末期肝病而死亡的人数多达100万<sup>[2]</sup>, 是一个严重的公共卫生问题。慢性乙型肝炎的治疗主要包括抗病毒、免疫调节、抗炎和抗氧化、抗纤维化及对症治疗, 其中抗病毒治疗是关键, 持续有效的抑制病毒能延缓

甚至阻滞肝病进程, 改善慢性HBV感染者生活质量<sup>[3]</sup>。但是抗HBV治疗, 阻断肝细胞内HBV的复制和表达, 仍是目前难题之一。近年来备受关注的RNA干扰技术, 为HBV基因治疗提供了新的策略。RNA干扰通过RNaseIII家族的Drosha酶和/或Dicer酶将双链RNA(dsRNA)切割成小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA), 降解与其同源的靶mRNA或抑制靶mRNA翻译, 从而下调靶基因表达<sup>[4]</sup>。这种机制存在几乎所有真核生物中<sup>[5]</sup>, 具有高效性、特异性等优点, 目前已有siRNA/shRNA抑制HBV复制与感染<sup>[6-9]</sup>报道, 但没有克服作用时间短暂等不足。为探讨RNAi抗HBV的作用效果, 解决RNAi作用时间短暂的问题, 本实验针对HBV pre-C/C区和S区基因序列, 设计构建重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV), 利用腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)宿主范围广、不致病、免疫原性低等优点<sup>[10]</sup>, 作为抗HBV的shRNA表达框的载体, 转染含HBV病毒基因组的HepG2.2.15细胞中, 观察对HBV复制和表达的抑制作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DMEM购自美国Gibco公司; 胎牛血清购自苏州四季青生物公司; 限制性内切酶BamH I、Xba I、Xho I、T4连接酶、Real-time PCR试剂盒均购自Takara生物技术公司; 转染试剂lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司; 质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒购自美国Promega公司; 质粒中提试剂盒购自北京全式金生物公司; 引物由北京市理化分析测试中心合成; DH5 $\alpha$ 感受态细胞购自Tigen公司; ELISA试剂盒购自上海科华公司; HepG2.2.15细胞由解放军302医院曲建慧副教授惠赠; 质粒pGe322、pGe522及PLRBR由北京军区总医院全军肝病治疗中心实验室前期合成并保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 HepG2.2.15细胞的培养及准备:** HepG2.2.15细胞复苏后生长于DMEM中(含10%胎牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺、100 U/mL青霉素及100  $\mu$ g/mL链霉素), 并在37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>孵箱中进行培养, 2-3 d更换培养液。

**1.2.2 靶位的选择及shRNA的设计:** 根据在GenBank中的HBV S基因及C基因作为靶序列, 同时根据shRNA设计原则, 靶位1(324-352)序列为: AACCTCCAATCACTCACCACCCTCTTGTC, 靶位2(2424-2452)序列为: GCTGGTGGCTC-

## ■ 研发前沿

近年来将AAV作为广泛应用的基因工程治疗载体, 利用其能使插入的siRNA表达时间延长, 可稳定发挥干扰作用, 解决RNA干扰抗HBV作用时间短暂的问题。

## ■创新盘点

RNAi作为一种全新的技术为防治乙型肝炎病毒感染提供了新的治疗思路,但是同时也有作用时间短暂等问题有待解决。直到最近几年因为AAV能使插入的siRNA表达时间延长,可稳定发挥干扰作用等优点,将AAV作为广泛应用的基因工程治疗载体,为解决RNAi作用时间短暂提供新的思路。

CAGTTCAGGAACAGTAAA.

1.2.3 重组载体的构建: (1)引物的合成: S1正义链5'-GATCCCGAACCTCCAATCACTCAC-CACCTCTGTGCGAAGCTTGGACAAGAG-GTTGGTGAGTGATTGGAGGTTTTTTTT-3', S1反义链: 5'-CTAGAAAAAA AACCTCCAAT-CACTCACCAACCTCTTGTCCAAGCTTCGACAAGAGGTTGGTGAGTGATTGGAGGTT CGG-3'; S2正义链: 5'-GATCCCGGCTGGTG-GCTCCAGTTCAGGAACAGTAAA GAAGCTT-GTTTACTGTTTCTGAACTGGAGCCAC-CAGCTTTTTT-3', S2反义链: 5'-CTAGAAAAAA GCTGGTGGCTCCAGTTCAGGAACAGTAAA CAAGCTTCTTTACTGTTTCTGAACTGGAGC-CACAGCCCGG-3'。以上引物均由北京理化分析测试中心合成; (2)引物退火, 琼脂糖电泳, 切胶, 行胶回收; (3)载体的构建及检测: 以限制性内切酶*Bam*H I、*Xba* I 分别线性化pGe322、pGe522载体, 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳检测并回收, 双链DNA分别与酶切回收产物连接, 应用T4连接酶、16 °C连接过夜, 形成pGe322-324、pGe522-324、pGe322-2424、pGe522-2424 4个重组载体。再将重组载体与PLRBR载体用限制性内切酶*Xba* I、*Xho* I 进行酶切, 37 °C水浴过夜。对重组载体及PLRBR载体进行琼脂糖凝胶电泳检测并回收, 再将PLRBR载体回收产物分别与4个重组载体回收产物连接, 应用T4连接酶、16 °C连接过夜, 形成PLRBR322-324、PLRBR522-324、PLRBR322-2424、PLRBR522-2424。将连接产物转化感受态细胞DH5 $\alpha$ 后铺于LB平板, 挑单个菌落进行过夜摇菌扩增, 质粒小提试剂盒提取质粒进行双酶切鉴定, 其电泳结果与实验预计结果相符。

1.2.4 转染HepG2.2.15细胞: 转染前用含0.25%胰酶-0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化后吹打成单细胞悬液, 细胞技术后接种于12孔培养板中, 放于孵箱中进行培养。约24 h后观察细胞生长铺满孔底面积约70%时用于转染。转染前更换无血清培养基, 质粒与Lipofectamine 2000脂质体按1:3共转染, 室温放置20 min后加入每孔中, 在孵箱中培养6 h候换DMEM中(含10%胎牛血清、2 mmol/L谷氨酰胺、100 U/mL青霉素及100  $\mu$ g/mL链霉素), 并在37 °C、5%CO<sub>2</sub>孵箱中进行培养。设空白对照组及转入空质粒的阴性对照组, 每组设3个复孔。

1.2.5 HBsAg、HBeAg及HBV-DNA的检测: 取转染后第1天、第2天、第3天及第10天上清液根据ELISA试剂盒实验步骤检测HBsAg、HBeAg。结果用S/N值(实验孔吸光度值/阴性对照孔吸光度值)表示。HBV-DNA检测: 将上清液吸出, 用磷酸盐缓冲液漂洗细胞, 制备细胞裂解液, 具体步骤按试剂盒说明书进行检测。

1.2.6 细胞核DNA的提取、纯化及测序: 取转染后3 d细胞, 留取上清液后, 按细胞DNA提取试剂盒步骤提取细胞DNA, 以细胞DNA为模板行PCR, 引物: 5'-AGGAACCCCTAGTGATGGAGT-3', 引物: 5'-TCAGAGGACATCACGTG-3', PCR产物送生物公司测序。

**统计学处理** 采用SPSS17.0数据包进行统计分析, 计量资料采用mean $\pm$ SD表示, 所得数据经正态性检验符合正态分布, 组间比较采用单因素方差分析, 多个均数之间两两比较采用LSD法, 以 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

## 2 结果

体外质粒转染细胞实验显示本实验合成的4个载体(图1-4)对HBsAg、HBeAg表达及HBV DNA复制均有抑制效应, PLRBR322-324、PLRBR522-324载体靶向于HBV S区, 其抑制HBsAg作用较明显, 其中PLRBR322-324第1天、第2天抑制效率分别为28.3%和49.9%, 第3天最高达68.6%, 到第10天仍然有56%的抑制率(表1)。PLRBR322-2424、PLRBR522-2424靶向于HBV pre-C/C区, 其抑制HBeAg作用较明显, 其中PLRBR322-2424前两天抑制效率分别为24.9%、46.3%, 第3天达最大抑制效率为67.1%, 第10天抑制率仍较高, 达到了51.3%(表2); PLRBR322-2424对HBV-DNA抑制效作用最强, 第1天、第2天抑制率分别为26.4%、43.3%, 第3天最大, 达到57%, 第10天仍保持有41.4%的稳定抑制效果。阴性对照组与空白对照组比较无统计学意义(表3)。

## 3 讨论

据世界卫生组织报告, 全球约有20亿人曾感染过HBV, 其中3.5亿人为慢性感染者。核苷(酸)类似物和干扰素 $\alpha$ (interferon- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ )是目前全球公认有效的抗HBV药物<sup>[1]</sup>, 但临床研究发现, 二者在使用过程中存在着应答率有限、停药后易反复等诸多问题, 而且干扰素治疗容易产生干扰素样反应, 核苷类药物易引起病毒变异继而耐



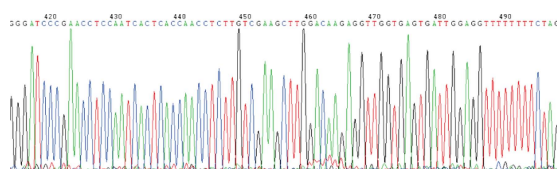


图 1 PLRBR322-324组测序结果.

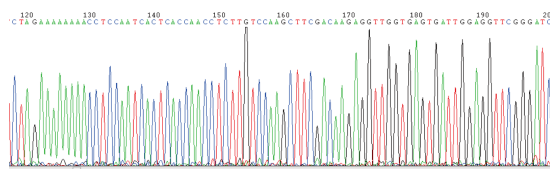


图 2 PLRBR522-324组测序结果.

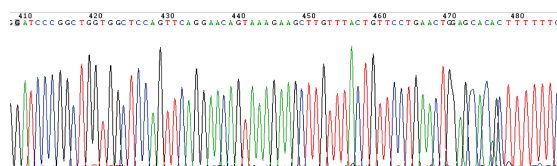


图 3 PLRBR 522-2424组测序结果.

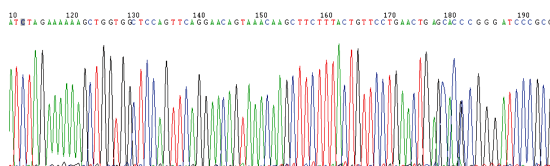


图 4 PLRBR 322-2424组测序结果.

## ■应用要点

本文可能为乙肝治疗提供一种新的途径, 可以长期、有效的抑制病毒的复制和表达, 改善远期预后, 使大多数患者受益.

表 1 上清液HBsAg检测结果

分组	第1天	第2天	第3天	第10天
PLRBR322-324	5.39 ± 0.11 <sup>a</sup>	7.76 ± 0.09 <sup>a</sup>	9.29 ± 0.06 <sup>a</sup>	8.93 ± 0.12 <sup>a</sup>
PLRBR522-324	5.49 ± 0.13 <sup>a</sup>	8.01 ± 0.11 <sup>a</sup>	10.94 ± 0.13 <sup>a</sup>	9.75 ± 0.15 <sup>a</sup>
PLRBR322-2424	6.32 ± 0.08 <sup>a</sup>	10.74 ± 0.14 <sup>a</sup>	18.72 ± 0.17 <sup>a</sup>	13.71 ± 0.1 <sup>a</sup>
PLRBR522-2424	6.46 ± 0.10 <sup>a</sup>	11.01 ± 0.07 <sup>a</sup>	18.55 ± 0.12 <sup>a</sup>	14.02 ± 0.13 <sup>a</sup>
空白对照组	7.51 ± 0.13	15.49 ± 0.13	29.50 ± 0.14	20.28 ± 0.11
阴性对照组	7.26 ± 0.11	15.25 ± 0.18	29.26 ± 0.13	19.98 ± 0.12

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 空白对照组.

药<sup>[12]</sup>, 为改善疗效, 许多学者进行了联合用药抗HBV的探索, 但在最终疗效的评定上出现了较多争议<sup>[13,14]</sup>. 由于HBV复制及逆转录过程中存在RNA阶段, 从而为RNAi提供了靶点<sup>[15]</sup>. 早期的实验将shRNA序列插入到质粒中, 已经证实能够明显地抑制HBV的复制和表达, 但只能产生短时间的基因沉默效果, 对细胞毒性也较大<sup>[16]</sup>. 为此很多学者进行了试验性的研究, 将AAV作为广泛应用的基因工程治疗载体, 基于以下优点<sup>[10,17-22]</sup>: (1) 可以广泛感染人细胞, 包括分裂期细胞和非分裂期细胞; (2) AAV本身无致病性; (3) 可以特异性整合于人类19号染色体长臂末端, 无致癌及致突变作用; (4) 以辅助质粒P-Helper代替辅助病毒进行重组腺相关病毒的包装; (5) 使插入的siRNA表达时间延长, 可稳定发挥干扰作用.

本实验将hu6-shRNA表达框置于AAV两个ITR之间, 之后接BCP和Rep基因, 构成rAAV, 作为抗HBV的shRNA表达框的载体. rAAV感染HepG2.2.15细胞后, BCP驱动Rep蛋白得以表达, 因Rep蛋白有促进复制、定点整合及拯救的作用, 因此LITR-hu6-shRNA-RITR可以复制, 使得rAAV的拷贝数大大增加. 但由于rAAV没有Cap

基因, 因此复制的rAAV基因组不能被包装成子代病毒颗粒, 只是拷贝数增加而已, 因而不会引起靶细胞裂解. 其基因组所携带的hu6-shRNA表达框, 通过RNAi途径, 发挥抗HBV作用. 随着时间的延迟, BCP-Rep被清除, Rep基因随之降解、消失, rAAV失去产毒性感染的条件, 因为Rep定点整合作用, 其基因组整合入AAVS1, 进入潜伏感染, 所携带的hu6-shRNA表达框也随之定点整合到AAVS1, 并随着细胞的分裂而分裂、复制, 持续生成shRNA, 通过RNAi稳定发挥抗HBV的作用<sup>[23]</sup>. 体外质粒转染细胞实验显示本实验合成的4个载体对HBsAg、HBeAg表达及HBV DNA复制均有抑制效应, PLRBR322-324、PLRBR522-324载体靶向于HBV S区, 其抑制HBsAg作用较明显, PLRBR522-2424靶向于HBV pre-C/C区, 其抑制HBeAg作用较明显, PLRBR322-2424对HBV-DNA抑制效作用最强, 说明通过RNAi抑制靶基因表达的有效性很大程度上取决于靶向的mRNA部位及与靶序列的匹配程度. 在本实验中针对单一一位点设计的shRNA表达质粒表现出对HBsAg、HBeAg以及HBV-DNA均有不同程度的抑制效应, 其原因可

## ■名词解释

RNA干扰(RNAi):指在进化过程中高度保守的、由双链RNA(dsRNA)诱发的、同源mRNA高效特异性降解的现象。由于使用RNAi技术可以特异性剔除或关闭特定基因的表达,所以该技术已被广泛用于探索基因功能和传染性疾病及恶性肿瘤的基因治疗领域。

表 2 上清液HBeAg检测结果

分组	第1天	第2天	第3天	第10天
PLRB322-324	6.51 ± 0.04 <sup>a</sup>	12.01 ± 0.11 <sup>a</sup>	20.32 ± 0.06 <sup>a</sup>	12.80 ± 0.13 <sup>a</sup>
PLRBR522-324	6.36 ± 0.11 <sup>a</sup>	11.89 ± 0.06 <sup>a</sup>	21.09 ± 0.08 <sup>a</sup>	12.68 ± 0.14 <sup>a</sup>
PLRBR322-2424	5.71 ± 0.08 <sup>a</sup>	8.37 ± 0.10 <sup>a</sup>	10.62 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.65 ± 0.09 <sup>a</sup>
PLRBR522-2424	5.75 ± 0.12 <sup>a</sup>	8.56 ± 0.08 <sup>a</sup>	11.96 ± 0.13 <sup>a</sup>	8.96 ± 0.11 <sup>a</sup>
空白对照组	7.60 ± 0.07	15.56 ± 0.15	32.25 ± 0.28	17.75 ± 0.07
阴性对照组	7.41 ± 0.23	15.32 ± 0.21	31.92 ± 0.11	17.50 ± 0.13

<sup>a</sup>P<0.05 vs 空白对照组。

表 3 上清液HBA-DNA检测结果 (10<sup>5</sup> copies/mL)

分组	第1天	第2天	第3天	第10天
PLRB322-324	1.29 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.05 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.77 ± 0.06 <sup>a</sup>
PLRBR522-324	1.32 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.76 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.15 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.81 ± 0.04 <sup>a</sup>
PLRBR322-2424	1.26 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.08 <sup>a</sup>
PLRBR522-2424	1.23 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.11 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.08 <sup>a</sup>
空白对照组	1.71 ± 0.02	2.89 ± 0.05	4.68 ± 0.07	2.95 ± 0.02
阴性对照组	1.63 ± 0.04	2.71 ± 0.09	4.51 ± 0.05	2.79 ± 0.06

<sup>a</sup>P<0.05 vs 空白对照组。

能在于针对某一位点的siRNA不仅能够使相应mRNA降解,同时可以降解HBV的全长mRNA。由于HBV的全长mRNA同时是逆转录模板,其降解会导致HBV-DNA的复制明显减低,从而减少转录产物mRNA的数量,进而减少各位点的表达量。针对细胞基因组AAVA1区域的测序结果可见目的序列,证明shRNA定点整合于细胞基因组,因此可以持续生成shRNA。与王玥等<sup>[24]</sup>实验结果最大抑制率达87.49%相比本实验抑制相对较低,可能与转染效率低相关,下一步拟将rAAV经同源重组的方法置入腺病毒基因组中,形成腺病毒/腺相关病毒杂合体病毒并进行病毒包装、扩增,再转染HepG2.2.15细胞,提高转染效率。与胡斌等<sup>[25]</sup>合成的载体相比,本载体中有Rep基因,shRNA能定点整合与细胞基因组,可发挥长期稳定的干扰基因表达的作用。

本研究表明以AAV作为载体,将shRNA置于其中后,通过转染靶细胞使shRNA定点整合入细胞内,从而可以长期稳定发挥抗HBV复制和表达的作用,为解决RNAi作用短暂的问题打下了基础,使之可能成为一种不同于传统乙肝治疗的新途径,可以长期、有效的抑制病毒的复制和表达,改善远期预后,使大多数患者受益。

## 4 参考文献

- Chien RN, Liaw YF. Thymalfasin for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2: 9-16 [PMID: 15482167 DOI: 10.1586/14787210.2.1.9]
- Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129 [PMID: 15014185 DOI: 10.1056/NEJMra031087]
- Morgan M, Keeffe EB. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B: 2009 update. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2009; 55: 5-22 [PMID: 19212304]
- Weinberg MS, Arbutnot P. Progress in the use of RNA interference as a therapy for chronic hepatitis B virus infection. *Genome Med* 2010; 2: 28 [PMID: 20429960 DOI: 10.1186/gm149]
- Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251 [PMID: 12110901 DOI: 10.1038/418244a]
- 边中启, 崔志磊, 陈维灶, 刘明秋, 严维耀, 郑兆鑫. siRNA抑制乙型肝炎病毒在HepG2215细胞中的复制与表达. *中华医学杂志* 2009; 89: 347-351
- 边中启, 孙璐璐, 陈维灶, 肖安, 马世武, 崔志磊, 刘霜, 刘明秋, 严维耀, 郑兆鑫. 靶向C基因的shRNA抗乙型肝炎病毒在BHK-21细胞中的复制与表达. *中华医学杂志* 2010; 90: 2776-2781
- Starkey JL, Chiari EF, Isom HC. Hepatitis B virus (HBV)-specific short hairpin RNA is capable of reducing the formation of HBV covalently closed circular (CCC) DNA but has no effect on established CCC DNA in vitro. *J Gen Virol* 2009; 90: 115-126 [PMID: 19088280 DOI: 10.1099/vir.0.004408-0]
- Ebert G, Poeck H, Lucifora J, Baschuk N, Esser K, Esposito I, Hartmann G, Protzer U. 5' Triphosphorylated small interfering RNAs control replication of

- hepatitis B virus and induce an interferon response in human liver cells and mice. *Gastroenterology* 2011; 141: 696-706, 706. e1-e3 [PMID: 21684282 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.05.001]
- 10 Flotte TR. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* 2004; 11: 805-810 [PMID: 15042119 DOI: 10.1038/sj.gt.3302233]
- 11 European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57: 167-185 [PMID: 22436845 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.02.010]
- 12 李文滨, 吴畏, 伍衡, 肖治宇, 林青, 王捷. RNA干扰沉默乙型肝炎病毒复制对肝癌细胞系HepG2.2.15生长的影响. *中华肝胆外科杂志* 2010; 16: 688-691
- 13 Janssen HL, van Zonneveld M, Senturk H, Zeuzem S, Akarca US, Cakaloglu Y, Simon C, So TM, Gerken G, de Man RA, Niesters HG, Zondervan P, Hansen B, Schalm SW. Pegylated interferon alpha-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet* 2005; 365: 123-129 [PMID: 15639293 DOI: 10.1016/S0140-6736(05)17701-0]
- 14 Buster EH, Ter Borg MJ, Vingerling JR, Janssen HL. Low incidence of retinopathy during peginterferon alpha-2b and lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2006; 45: 160-161; author reply 160-161 [PMID: 16723166 DOI: 10.1016/j.jhep.2006.04.003]
- 15 杨慧, 赵龙凤, 赵中夫, 张国英, 刘明社. 短发夹RNA介导的RNA干扰技术在HepG2.2.15细胞中的应用研究. *中国药物与临床* 2011; 11: 502-504, I0001
- 16 张正茂, 田拥军, 孟忠吉, 雷延昌, 李新宇, 王宝菊, 杨东亮. RNA干扰抑制人乙型肝炎病毒复制的研究. *中国病毒学* 2006; 21: 348-352
- 17 McCarty DM, Young SM, Samulski RJ. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 819-845 [PMID: 15568995 DOI: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143717]
- 18 Shiau AL, Liu PS, Wu CL. Novel strategy for generation and titration of recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* 2005; 79: 193-201 [PMID: 15596815 DOI: 10.1128/JVI.79.1.193-201.2005]
- 19 Smith-Arica JR, Bartlett JS. Gene therapy: recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Cardiol Rep* 2001; 3: 43-49 [PMID: 11139798 DOI: 10.1007/s11886-001-0009-x]
- 20 Daly TM. Overview of adeno-associated viral vectors. *Methods Mol Biol* 2004; 246: 157-165 [PMID: 14970590]
- 21 Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 99: 119-145 [PMID: 16568890 DOI: 10.1007/10\_005]
- 22 Malecki M, Woźniak A, Janik P. [Adeno-associated viruses (AAV)]. *Postepy Biochem* 2008; 54: 57-63 [PMID: 18610582]
- 23 李绍祥, 张艳霞, 张成平, 胡学玲, 李娟, 姚鹏, 胡大荣. Ad/rAAV杂合体病毒介导抗HBV shRNA表达框定点整合研究. *中国现代医学杂志* 2010; 21: 3254-3262
- 24 王玥, 牛俊奇, 丁艳华, 王峰. 应用RNA干扰抑制乙型肝炎病毒复制和表达. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 790-792
- 25 胡斌, 杨燕, 刘嘉, 马智勇, 黄红平, 余源, 刘慎沛, 杨东亮. 表达HBsAg特异性SiRNA的重组腺相关病毒载体的构建. *实用肝脏病杂志* 2010; 13: 161-165

#### 同行评价

本文设计合理, 具有一定创新性, 可为乙型肝炎治疗提供新的思路。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



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

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》栏目设置

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



## 以肝病症状为首发表现的肝豆状核变性93例

林连捷, 王东旭, 郑长青, 曹男, 丁楠楠

### ■背景资料

肝豆状核变性(W-D)是以铜代谢障碍为特征的常染色体单基因隐性遗传疾病, 此病于1912年由Wilson首次描述。1952年, Sternlieb等确立WD临床诊断标准。1993年, Bull等将WD致病基因准确地定位于染色体13q14.3。此基因称为ATP7B基因, 编码一种铜转运P型ATP酶, 其突变导致铜与前铜蓝蛋白结合, 使转运蛋白铜蓝蛋白减少, 大量未经结合的铜进入血循环, 在脑、肝、肾、角膜等组织沉积而发病。

林连捷, 王东旭, 郑长青, 曹男, 丁楠楠, 中国医科大学附属盛京医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004

林连捷, 副教授, 副主任医师, 主要从事慢性肝病方面的研究。

辽宁省科学技术基金资助项目, No. 2010225008

辽宁省博士科研启动基金资助项目, No. 20081048

沈阳市科学技术基金资助项目, No. F10-205-1-7

作者贡献分布: 林连捷与王东旭对此文所作贡献均等; 此课题由林连捷与王东旭设计; 研究过程由林连捷、王东旭、郑长青、曹男及丁楠楠共同完成; 数据分析与论文写作由林连捷与王东旭完成。

通讯作者: 林连捷, 副教授, 副主任医师, 110004, 辽宁省沈阳市铁西区滑翔路39号, 中国医科大学附属盛京医院消化内科。  
audreylin73@hotmail.com

收稿日期: 2013-01-19 修回日期: 2013-02-20

接受日期: 2013-03-08 在线出版日期: 2013-03-28

### Wilson's disease with hepatic manifestations as the first presentation: An analysis of 93 cases

Lian-Jie Lin, Dong-Xu Wang, Chang-Qing Zheng, Nan Cao, Nan-Nan Ding

Lian-Jie Lin, Dong-Xu Wang, Chang-Qing Zheng, Nan Cao, Nan-Nan Ding, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Science and Technology Project of Liaoning Province, No. 2010225008; the Doctoral Scientific Research Foundation of Liaoning Province, No. 20081048; the Science and Technology Project of Shenyang, No. F10-205-1-7

Correspondence to: Lian-Jie Lin, Associate Professor, Associate Chief Physician, Department of Gastroenterology, Shengjing Hospital, China Medical University, 39 Huaxiang Street, Tiexi District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. audreylin73@hotmail.com

Received: 2013-01-19 Revised: 2013-02-20

Accepted: 2013-03-08 Published online: 2013-03-28

### Abstract

**AIM:** To analyze the clinical data for patients with Wilson's disease with hepatic manifestations as the first presentation to provide a reference for the diagnosis of this disease.

**METHODS:** The clinical data for 93 patients with Wilson's disease with hepatic manifestations as the first presentation, who were treated at our hospital from January 1993 to April 2010, were reviewed retrospectively.

**RESULTS:** The age of onset ranged from 4 to 49

years. The average course before achieving a definite diagnosis was 17.48 mo. Main first symptoms were jaundice (47.31%), fatigue (39.78%), and nausea and vomiting (37.63%). Main clinical presentation was cirrhosis. The positive rate of corneal K-F ring was 91.67%. The rate of abnormal urinary copper was 84.48%, and serum ceruloplasmin was abnormal in 81.40% of cases. Varying degrees of abnormality of liver function and blood coagulation were also observed. The percentage of patients showing abnormal liver and spleen ultrasound manifestations was 97.37%. The misdiagnosis rate was 61.29%.

**CONCLUSION:** Patients who are suspected to have Wilson's disease with hepatic manifestations as the first presentation should undergo timely determination of K-F ring, 24-h urinary copper, serum ceruloplasmin, and abdominal ultrasound to improve early diagnosis, treatment, prognosis, and reduce misdiagnosis.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Wilson's disease; Clinical analysis; K-F ring; Ceruloplasmin; Misdiagnosis

Lin LJ, Wang DX, Zheng CQ, Cao N, Ding NN. Wilson's disease with hepatic manifestations as the first presentation: An analysis of 93 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 820-823 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/820.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.820>

### 摘要

**目的:** 分析以肝病症状为首发表现肝豆状核变性患者的临床资料, 指导本病的诊断。

**方法:** 回顾性分析1993-01/2010-04于我院首诊的93例以肝病为首发表现肝豆状核变性患者的临床资料。

**结果:** 发病年龄4-49岁; 确诊前平均病程17.48 mo; 首发症状依次为黄疸(47.31%), 乏力(39.78%), 恶心呕吐(37.63%); 临床主要表现为肝硬化; 角膜K-F环阳性率91.67%, 尿铜异常率84.48%, 血清铜蓝蛋白异常率81.40%, 肝功及凝血指标有不同程度的异常, 肝胆脾超声

### ■同行评议者

白岚, 教授, 主任医师, 南方医院惠侨科

异常率97.37%; 首诊误诊率达61.29%。

**结论:**对可疑肝豆状核变性的肝病患者应及时行K-F环、血清铜蓝蛋白、24 h尿铜、肝胆脾超声等检查, 早期进行诊治, 减少误诊, 改善预后。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 肝豆状核变性; 诊断; K-F环; 铜蓝蛋白; 误诊

林连捷, 王东旭, 郑长青, 曹男, 丁楠楠. 以肝病症状为首表现的肝豆状核变性93例. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 820-823 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/820.asp>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.820>

## 0 引言

肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD), 又名Wilson病(Wilson's disease, WD), 是一种常染色体隐性遗传铜代谢障碍疾病, 世界范围内的发病率为1/30 000-1/100 000<sup>[1]</sup>. 由于铜在体内异常蓄积的部位不同, 本病可出现多系统、多器官的病变, 最常受累的器官为肝脏、脑、角膜. 此外, 还可累及肾脏、胰腺、皮肤、心脏和血液等器官<sup>[2]</sup>, 本研究通过回顾性分析我院收治的93例以肝病症状为首表现的WD患者的临床资料, 提高临床医生对该病的认识, 指导该病的早期诊断, 减少误诊与漏诊。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院1993-01/2010-04收治的以肝病症状为首表现的首诊WD患者共93例, 其中男48例, 女45例, 男女比例为1.07:1, 年龄4-49岁, 平均(11.84±6.81)岁, 其中0-14岁者75例(80.64%), 15-40岁者17例(18.28%), >40岁者1例(1.08%); 仅有2例患者有明确家族史。

**1.2 方法** 根据Sternlieb诊断标准<sup>[3]</sup>, 至少具备以下4项中的两项者可以确诊: (1)肝病史和肝病症状; (2)肉眼或裂隙灯下角膜色素环(K-F环)阳性; (3)血清铜蓝蛋白降低; (4)出现震颤、肌强直及面具样面容等神经系统表现. 若为非典型病例, 可结合患者临床表现、实验室检查铜代谢异常, 24 h尿铜排泄增多、血铜减少、D-青霉胺治疗有效及阳性家族史明确诊断. 回顾性分析93例患者的临床资料, 内容包括病程、临床表现、实验室检查及影像学检查等。

**统计学处理** 应用SPSS17.0统计软件进行分

析, 计量资料以mean±SD表示。

## 2 结果

### 2.1 临床表现

**2.1.1 首发症状:** 黄疸44例(47.31%), 乏力37例(39.78%), 恶心呕吐35例(37.63%), 发热31例(33.33%), 腹胀31例(33.33%), 茶色尿27例(29.03%), 食欲不振24例(25.81%), 腹痛19例(20.43%), 腹泻4例(4.30%), 腹水21例(22.58%), 黑便4例(4.30%)。

**2.1.2 临床表现:** 表现为肝硬化的有50例(53.76%), 其中单纯无症状性肝硬化占8.00%(4/50)、肝功能失代偿或门脉高压占68.00%(34/50)、肝硬化基础上急性肝衰竭占24.00%(12/50); 急性肝炎19例(20.43%); 暴发性肝衰竭15例(16.13%); 无症状性转氨酶升高5例(5.38%); 表现为慢性肝病4例(4.30%)。

**2.2 实验室检查** 共有60例患者完善K-F环检查, 55例K-F环阳性, 阳性率91.67%, 其他实验室检查见表1. 共有76例患者完善肝胆脾超声检查, 有74例患者可见超声异常, 超声异常率达97.37%, 异常表现分布如下: 弥漫性肝损伤/肝硬化63.51%(47例), 脾大45.95%(34例), 腹腔积液43.24%(32例), 胆囊壁厚/不光滑33.78%(25例), 肝大27.03%(20例), 肝内胆管结石/胆囊结石8.11%(6例), 腹腔内淋巴结肿大6.76%(5例). 部分患者同时合并有多项肝胆脾超声异常。

共有25例患者完善了头MRI检查, 有7例患者存在异常, 异常率在28.0%, 其中累及基底节3例, 苍白球3例, 侧脑室2例, 枕叶1例, 红核1例, 黑质1例, 部分患者同时累及多部位脑实质。

上述患者经我院确诊前的病程长短不一, 少数患者是以急性起病, 多数患者慢性起病, 病程时间较长, 所有患者病程分布在1 d-12年不等, 确诊前的平均病程17.48 mo; 初步诊断即诊断为肝豆状核变性的有36人(38.71%), 其余患者的初步诊断均存在不同程度的误诊, 首诊误诊率达61.29%, 误诊情况涉及消化、肾内、血液、风湿免疫、感染等多个科室, 其中误诊为肝硬化21例, 急性肝炎18例, 溶血性贫血7例, 急性肝衰竭4例, 嗜血细胞综合征、血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮、肾炎、急性胃炎、细菌性腹膜炎、结核性腹膜炎各1例。

## 3 讨论

WD是以铜代谢障碍为特征的常染色体单基因隐性遗传疾病, 此病于1912年由Wilson首次描

### ■研究前沿

WD患者在铜代谢指标、肝功及凝血指标方面均有不同程度的异常. CER也是WD诊断的重要指标, 另外CER做为一种极相反应蛋白, 部分WD患者由于感染或炎症而造成血清CER正常或升高. 而肝功各项指标及凝血指标的亦可见明显的异常, 表明了肝病为首表现的WD患者在肝脏合成、代谢能力等各方面的受损。

## ■应用要点

对93例以肝病症状为首表现的WD患者的临床资料进行回顾性分析,以期提高临床医生对该病的认识,指导该病的早期诊断,减少误诊及漏诊。

表 1 肝豆状核变性患者实验室检查指标阳性率

指标	参考值	阳性例数/检查例数(n)	阳性率(%)	最小值	最大值	平均(mean ± SD)
CER(mg/L)	< 200	70/82	81.40	20.0	710.0	130.25 ± 106.01
尿Cu(μg/24 h)	> 100	49/58	84.48	17.0	3 685.0	1765.06 ± 966.72
血Cu(μmol/L)	< 63	50/75	66.67	6.7	173.1	56.16 ± 40.59
ALT(U/L)	> 40	57/90	63.33	1.2	945.0	131.46 ± 103.55
AST(U/L)	> 34	40/53	75.47	16.0	545.0	110.26 ± 93.60
ALP(U/L)	> 150	50/87	57.47	10.0	829.0	212.76 ± 156.67
γ-GT(U/L)	> 64	37/62	59.65	14.0	333.0	98.75 ± 73.75
TBil(μmol/L)	> 20.5	54/88	61.36	4.3	710.7	112.19 ± 96.28
DBil(μmol/L)	> 8.6	43/75	57.33	0.8	194.1	56.84 ± 34.21
UDBil(μmol/L)	> 11.9	55/87	63.22	1.3	386.2	56.76 ± 45.31
PT(s)	> 13.5	37/44	84.09	11.1	41.6	22.44 ± 9.17
APTT(s)	> 37.0	29/41	70.73	19.2	78.7	46.31 ± 14.84
FIB(g/L)	< 2.0	32/42	76.19	0.42	2.97	1.15 ± 0.65
TT(s)	> 19.5	23/38	60.53	8.1	33.6	21.49 ± 4.90

CER: 铜蓝蛋白; Cu: 铜; ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 天冬氨酸氨基转移酶; ALP: 碱性磷酸酶; γ-GT: γ-谷氨酰转氨酶; TBil: 总胆红素; DBil: 直接胆红素; UDBil: 间接胆红素; PT: 凝血酶原时间; APTT: 活化部分凝血酶时间; FIB: 纤维蛋白原; TT: 凝血酶时间。

述, 1952年, Sternlieb<sup>[4]</sup>确立WD临床诊断标准。1993年, Bull等将WD致病基因准确地定位于染色体13q14.3。此基因称为ATP7B基因, 编码一种铜转运P型ATP酶, 其突变导致铜与前铜蓝蛋白结合, 使转运蛋白铜蓝蛋白减少, 大量未经结合的铜进入血循环, 在脑、肝、肾、角膜等组织沉积而发病<sup>[5]</sup>。本病多见于儿童及青少年, 多数患者在5-35岁之间发病, 一般18岁以下者的首发症状以肝损害居多, 成年期则多以锥体外系症状为首表现<sup>[6-8]</sup>。从本研究结果看, 发病年龄在14岁以下的比例在80.64%, 但仍有一例49岁患者以肝病为首表现而被诊断, 故在临床工作中应重视高龄患者的诊治, 以免造成误诊或漏诊。从首发症状上看, 以黄疸、乏力及恶心呕吐占前3位, 虽无明显的特异性, 但也从一定程度上反映了患者肝功能的受损。从临床表现上看, 肝硬化的比例高达50.0%, 这提示我们对于病因不明的肝硬化患者, 尤其是青少年肝硬化患者, 要警惕WD的可能。

K-F环是由铜沉积在角膜的后弹力层所致, 为靠近角膜周围缘的金黄色或褐色的色素环, 被认为是WD的重要阳性体征。本组研究中可见K-F环的阳性率可达91.67%, 充分表现了K-F在本病中的意义, 但仍有8.33%的患者K-F环阴性, 且曾有文献报道, 当患者以肝损害为主而无神经系统损害时K-F环检出率仅为44%-62%<sup>[6]</sup>。因此临床工作中不应忽视K-F阴性的WD患者的

诊断。此外, 在一些慢性胆汁淤积性疾病以及新生儿胆汁淤积病中也可出现K-F环阳性, 故应注意排除此类“假阳性”疾病。

WD在铜代谢指标、肝功及凝血指标方面均有不同程度的异常: 铜代谢指标中可见24 h尿铜异常率在84.48%, 表明了24 h尿铜在WD诊断中的重要意义, 此外, 对于24 h尿铜增加不明显者亦可行青霉胺试验(一次性口服青霉胺0.5 g, 若6 h尿铜>300 μg有诊断意义)指导诊断<sup>[9]</sup>。CER也是WD诊断的重要指标, 本组研究中CER阳性率在81.40%, 但是, 还应注意到CER降低可能与基因变异引起的无铜蓝蛋白血症或低铜蓝蛋白血症<sup>[10]</sup>肾病综合征、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化某些吸收不良综合征等同样也可以导致CER降低, 另外CER做为一种急相反应蛋白, 部分WD患者由于感染或炎症而造成血清CER正常或升高<sup>[11]</sup>。故应辩证看待CER在WD疾病中的变化; 而肝功各项指标及凝血指标亦可见明显的异常, 表明了肝病为首表现的WD患者在肝脏合成、代谢能力等各方面受损。

在影像学检查上, 肝胆脾超声异常率可高达97.37%。由于WD肝病病理改变从轻到重分为4期: 肝脂肪变性期、肝炎期、肝纤维化期及肝硬化期, 故在肝胆脾超声检查上可见到各种异常的表现: 包括肝脏增大、回声粗糙(弥漫性肝损伤)、肝脏缩小(肝硬化)。另外, 发生于青少年的胆囊结石、胆囊壁水肿、脾脏肿大等声像特



点, 可为WD的诊断提供支持<sup>[12]</sup>. 肝周脂肪层显著增厚也可作为WD诊断的佐证<sup>[13]</sup>. 因此, 肝胆脾超声对于发现是以肝病为首表现的患者肝脏受损情况有着重要的意义. 而MRI结果异常率仅为28.0%, 考虑与本组患者首发表现为肝病表现为主, 铜主要沉积部位在肝脏.

所有入组患者的首诊误诊率在61.29%, 分析原因在于以下几个方面: (1)临床医生对本病缺乏认识, 思维局限, 遇到转氨酶升高、上消化道出血等往往只考虑肝炎、肝硬化, 而忽视了鉴别诊断中的少见病, 这是造成部分患者长期误诊及多次误诊的主要原因; (2)忽视对K-F环、CER、24 h尿铜等指标的检查, 尤其是对于不明原因的肝病、青少年肝硬化的患者而言, 这些检查项目有着重要的意义; (3)部分WD患者由于合并了病毒性肝炎或者肝硬化, 而造成漏诊.

WD做为少数可有效控制的遗传性疾病, 其病情的轻重与基因突变类型的相关性关系并不大<sup>[14]</sup>, 主要与铜在体内的蓄积量及时间长短密切相关<sup>[15]</sup>, 所以早期诊断与治疗对WD患者尤为重要. 因此, 这要求我们临床医生在临床工作中加强对本病的认识, 对于不明原因的肝炎、肝衰竭、青少年肝硬化以及既往有WD家族史的肝病患者要警惕WD的可能, 及时行K-F环、血清CER、24 h尿铜, 肝胆脾超声等检查, 对于诊断不明确的患者可以考虑行肝铜含量测定(肝铜含量 $\geq 250 \mu\text{g/g}$ 肝干质量是WD的最佳诊断指标<sup>[16]</sup>)或基因检测, 以早期诊治, 改善患者预后.

#### 4 参考文献

- 1 Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's disease. *Lancet* 2007; 369: 397-408 [PMID: 17276780 DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60196-2]
- 2 吴建红, 吕晓光, 华影, 谭小平, 张建新. 肝豆状核变性的循证治疗. *中国全科医学* 2012; 15: 289
- 3 Sternlieb I. Wilson's disease. *Clin Liver Dis* 2000; 4: 229-239, viii-ix [PMID: 11232186 DOI: 10.1016/S1089-3261(05)70105-7]
- 4 Sternlieb I. Perspectives on Wilson's disease. *Hepatology* 1990; 12: 1234-1239 [PMID: 2227823]
- 5 中华医学会神经病学分会帕金森病及运动障碍学组, 中华医学会神经病学分会神经遗传病学组. 肝豆状核变性的诊断与治疗指南. *中华神经科杂志* 2008; 41: 566-569
- 6 Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Stremmel W. Clinical presentation, diagnosis and long-term outcome of Wilson's disease: a cohort study. *Gut* 2007; 56: 115-120 [PMID: 16709660 DOI: 10.1002/hep.1840120526]
- 7 Mak CM, Tam S, Fan ST, Liu CL, Lam CW. Wilson's disease: a patient undiagnosed for 18 years. *Hong Kong Med J* 2006; 12: 154-158 [PMID: 16603785]
- 8 Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology* 2008; 47: 2089-2111 [PMID: 18506894 DOI: 10.1002/hep.22261]
- 9 朱贞祥, 董玲, 朱新宇, 沈锡中, 翁书强. 肝豆状核变性69例临床病例分析. *中华消化杂志* 2012; 32: 46-48
- 10 郑国庆, 周云, 南燕, 吴斌. 儿童肝豆状核变性26例临床分析. *实用医学杂志* 2010; 26: 3571-3573
- 11 林连捷, 郑长青. Wilson病的诊断和治疗. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1614-1617
- 12 胡纪源, 洪铭范, 苏增锋, 程楠, 韩咏竹, 杨任民. 1200例肝豆状核变性的肝脾胆肾声像图表现及临床研究. *中国临床神经科学* 2003; 11: 161-165
- 13 Akhan O, Akpınar E, Oto A, Köroğlu M, Özmen MN, Akata D, Bijan B. Unusual imaging findings in Wilson's disease. *Eur Radiol* 2002; 12 Suppl 3: S66-S69 [PMID: 12522607]
- 14 Schmidt HH. Role of genotyping in Wilson's disease. *J Hepatol* 2009; 50: 449-452 [PMID: 19118916 DOI: 10.1016/j.jhep.2008.11.008]
- 15 杨建栋, 窦科峰. 肝豆状核变性诊疗进展. *第四军医大学学报* 2009; 30: 2252-2254
- 16 李新华, 张欣欣. 肝豆状核变性诊疗进展 - 美国肝病学会诊疗指南专题报道. *诊断学理论与实践* 2009; 8: 222-229

#### ■同行评价

本文结合分析病历资料, 对临床医生具有一定实用价值.

编辑 田滢 电编 鲁亚静



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

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

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

# 自身免疫性胰腺炎7例

杨 旸, 姜沫含, 孙明军

## ■背景资料

自身免疫性胰腺炎(AIP)是由自身免疫介导的一种慢性胰腺炎。目前全球范围内对AIP认识仍处于早期阶段。我国自2004年以来相继有关于AIP的病例报道, 但对其总体认识水平及重视程度仍与欧美国家有一定差距, 相关科研与临床水平有待进一步提高。

杨旸, 姜沫含, 孙明军, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

杨旸, 主要从事消化系统疾病的研究。

作者贡献分布: 此课题由孙明军设计; 资料收集与数据分析由杨旸与姜沫含共同完成; 课题研究与论文写作由杨旸完成; 论文校审由孙明军完成。

通讯作者: 孙明军, 教授, 主任医师, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院消化内科。smjwm@163.com

收稿日期: 2013-01-17 修回日期: 2013-02-24

接受日期: 2013-03-08 在线出版日期: 2013-03-28

## Clinical characteristics of autoimmune pancreatitis: An analysis of 7 cases

Yang Yang, Mo-Han Jiang, Ming-Jun Sun

Yang Yang, Mo-Han Jiang, Ming-Jun Sun, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China  
Correspondence to: Ming-Jun Sun, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. smjwm@163.com

Received: 2013-01-17 Revised: 2013-02-24

Accepted: 2013-03-08 Published online: 2013-03-28

## Abstract

**AIM:** To analyze and summarize the clinical characteristics of autoimmune pancreatitis (AIP) for the purpose of improving its diagnosis and treatment.

**METHODS:** The clinical data for 7 patients with autoimmune pancreatitis who were hospitalized in the past two years were analyzed retrospectively.

**RESULTS:** Main clinical manifestations were obstructive jaundice in 7 cases (100%), mild abdominal pain or epigastric discomfort in 3 cases (42.9%), weakness or weight loss in 5 cases (71.4%), diarrhea in 3 cases (42.9%), abdominal distension in 2 cases (28.6%), and dyspepsia in 2 cases (28.6%). All 7 patients had elevated serum gamma globulins (100%). Six (85.7%) patients had elevated serum IgG, aminotransferase and FBG, and four patients had elevated CA199

(57.1%). Two (28.6%) patients tested positive for RF and AMA, and three (42.9%) positive for ANA. Diffuse or localized enlargement of the pancreas was revealed by B ultrasound in 4 cases and CT in 6 cases. MRCP showed narrowing of the pancreatic section of the common bile duct in 6 cases. ERCP demonstrated narrowing of the pancreatic section of the common bile duct and the head segment of the main pancreatic duct in 4 cases. Six patients underwent steroid therapy, which was effective in all patients. Three out of six cases (including 2 cases without sufficient course of treatment) recurred and turned better after receiving steroid therapy again. Jaundice relieved in three cases after ERCP-guided common bile duct stent implantation.

**CONCLUSION:** The clinical manifestations of AIP show some characteristics. Accurate diagnosis and treatment of AIP rely on clinical symptoms, imaging features, serum examinations and response to steroid therapy.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Autoimmune pancreatitis; Clinical manifestation; Diagnosis; Treatment

Yang Y, Jiang MH, Sun MJ. Clinical characteristics of autoimmune pancreatitis: An analysis of 7 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2013; 21(9): 824-828 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/824.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.824>

## 摘要

**目的:** 分析自身免疫性胰腺炎(autoimmune pancreatitis, AIP)的临床特征, 提高对AIP的诊断及治疗水平。

**方法:** 回顾性分析我院近2年来诊治的7例AIP患者资料。

**结果:** 临床表现: 7例患者均出现梗阻性黄疸(100%), 轻度腹痛或上腹不适3例(42.9%), 乏力、体质量减轻5例(71.4%), 腹泻3例(42.9%), 腹胀和食欲减退各2例(28.6%)。实验室检查: 7例血γ球蛋白比例均升高(100%), 6

## ■同行评议者

陈海龙, 教授, 大连医科大学附属第一医院院办

例(85.7%)IgG水平升高, 转氨酶升高者6例(85.7%), CA199升高者4例(57.1%), 空腹血糖升高者6例(85.7%), RF阳性者和抗线粒体抗体(antimitochondrial antibody, AMA)阳性者分别为2例(28.6%), 抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)阳性者3例(42.9%)。影像学表现: 4例行B超检查和6例行CT检查均表现为胰腺弥漫性或局限性肿大, 6例行MRCP均显示胆总管胰腺段狭窄, 4例行ERCP均显示胆总管胰腺段狭窄和主胰管胰头段狭窄。治疗: 6例患者应用激素治疗均有效, 其中3例复发(2例激素未用至足够疗程)再次应用激素均有效。3例行ERCP胆总管支架植入术后黄疸好转。

**结论:** AIP临床表现具有一定特征, 应综合分析其临床症状、血清学检查、影像学表现及对激素治疗的反应等因素对AIP作出早期正确的诊断及治疗。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 自身免疫性胰腺炎; 临床特征; 诊断; 治疗

杨咏, 姜沫含, 孙明军. 自身免疫性胰腺炎7例. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 824-828 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/824.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.824>

## 0 引言

自身免疫性胰腺炎(autoimmunepancreatitis, AIP)是由自身免疫介导的一种慢性胰腺炎。患者多无酒精嗜好, 临床上有如下特点: 梗阻性黄疸、高球蛋白血症、胰腺弥漫性肿大、胆胰管不同程度狭窄、显著的淋巴细胞浸润伴纤维化。目前全球范围内对AIP认识仍处于早期阶段, 2004年我国自唐令诤等<sup>[1]</sup>首次报道1例有组织学证据, 对泼尼松等糖皮质激素反应良好的AIP患者以来, 诊断明确的病例不多, 但提示我国亦存在AIP患者。本文对我院近2年来诊治的7例AIP患者的临床特征进行回顾性分析。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择2010-08/2012-08收住中国医科大学附属第一医院消化科的AIP患者7例, 男6例, 占85.7%, 女1例, 占14.3%; 年龄43-74岁, 平均59.4岁±10.9岁。

### 1.2 方法

**1.2.1 诊断标准:** 采用亚洲标准<sup>[2]</sup>(1)影像学(2条必备): 胰腺实质影像学: 腺体弥漫性/局限性/局灶

性增大, 有时伴有包块和/或低密度边缘; 胰胆管影像学: 弥漫性/局限性/局灶性胰管狭窄, 常伴有胆管狭窄; (2)血清学(可仅具备一条): 血清高水平IgG或IgG4; 其他自身抗体阳性; (3)组织学: 胰腺病变部位活检示淋巴浆细胞浸润伴纤维化, 有大量IgG4阳性细胞浸润。其中2条影像学为必备条件, 血清学和组织学可仅具备其一; 手术切除的胰腺标本组织学表现为淋巴浆细胞硬化性胰腺炎(lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis, LPSP)时, 也可作出AIP诊断。(4)可选择的标准: 对激素治疗的反应。在患者仅满足影像学2条必备条件, 且胰胆肿瘤检查指标均为阴性的情况下, 激素试验性治疗可在胰腺专家的密切注视下进行。

**统计学处理** 计量资料以mean±SD表示, 计数资料以例数或百分率进行描述, 正常参考范围为常规实验室结果。

## 2 结果

**2.1 临床表现** 7例患者均出现梗阻性黄疸(100%), 轻度腹痛或上腹不适3例(42.9%), 乏力、体质量减轻5例(71.4%), 腹泻3例(42.9%), 腹胀和食欲减退各2例(28.6%), 1例表现为: 双侧颌下及左侧腋下淋巴结肿大、双侧腹股沟多发淋巴结肿大, 1例可见腹膜后小淋巴结影, 6例血糖升高患者中4例确诊为糖尿病, 3例并发间质性肺炎, 3例并发自身免疫性肝病, 1例合并硬化性胆管炎, 4例合并胆囊或胆管结石, 另1例出现口干眼干等症状并确诊为结缔组织病。

**2.2 实验室检查** 所有患者血γ球蛋白比例均升高 $31.2\% \pm 6.1\%$ ; 7例患者中6例(85.7%)IgG水平升高, 平均浓度( $21.70 \text{ g/L} \pm 12.18 \text{ g/L}$ ), 其中3例行IgG4检查, 化验值均升高; 只有1例血清淀粉酶升高 $72.7 \text{ U/L} \pm 49.2 \text{ U/L}$ ; 除1例直接胆红素高达 $221.8 \text{ mmol/L}$ 外, 其余患者血清胆红素均呈轻中度升高, 直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)( $65.08 \text{ mmol/L} \pm 83.19 \text{ mmol/L}$ ); 转氨酶升高者6例(85.7%), 丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT) $241.0 \text{ U/L} \pm 190.4 \text{ U/L}$ ; CA199升高者4例(57.1%)( $69.4 \text{ U/mL} \pm 64.2 \text{ U/mL}$ ), 空腹血糖升高者6例(85.7%) $53.28 \text{ U/mL} \pm 1.90 \text{ U/mL}$ , 其中4例确诊为糖尿病。另外, 类风湿因子(rheumatoid factor, RF)阳性者和抗线粒体抗体(antimitochondrial antibody, AMA)阳性者分别为2例(28.6%), 抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)阳性者3例(42.9%); 7例患者均进行抗SSA/SSB、

## ■ 研发前沿

目前普遍认为组织学是诊断AIP的金标准, 但由于胰腺的特殊性, 获得满意的活检标本较为困难, 胰腺活检在诊断中的作用仍有争议。如何在避免开腹损伤的情况下做出及时正确的诊断有待进一步探讨研究。

## ■ 相关报道

吕红等研究表明16例患者中嗜酸性粒细胞升高者占43.7%, 本研究中7例患者中嗜酸性粒细胞计数和比例均在正常范围内。就此还需进行大样本资料调查分析, 明确嗜酸性粒细胞升高是否对AIP有临床意义及其机制。



### ■创新盘点

本研究中7例患者无1例因误诊而行开腹探查术,而是综合考虑患者临床表现、实验室检查、影像学特征表现及试验性激素治疗有效性等做出最后诊断,避免了损伤,并且根据患者病情特殊性采取以激素治疗为主联合ERCP胆管支架植入术或熊去氧胆酸等药物治疗,取得良好疗效。

抗平滑肌抗体(anti-smooth muscle antibody, SMA)检测,均为阴性。

**2.3 影像学检查** 6例行CT检查的患者均有胰腺肿大伴胆道低位梗阻,其中5例(83.3%)呈弥漫性肿大,其中1例(16.7%)外周见鞘膜样结构。1例(16.7%)呈局限性肿大,肿大部位位于胰头。4例行增强CT检查,可见增强后强化程度减低,胰腺轮廓不光滑,周围可见少量索条影。4例行B超检查示肿大胰腺(3例为弥漫性肿大,1例为局限性肿大)呈低回声。行MRCP检查的6例患者全部表现为胆道梗阻:胆总管胰腺段管壁增厚,管腔呈线性狭窄,上游胆道扩张。其中1例(16.7%)胰管粗细不均,2例(33.3%)可见胰腺体尾部饱满,体积增大,信号不均匀,增强扫描后不均匀强化,边界毛糙,可见低信号软组织包膜。4例行ERCP结果示:胆总管胰腺段狭窄,狭窄段光滑,伴上游胆管、肝管扩张。其中1例(25%)主胰管胰头段狭窄并可见部分胆管呈串珠样。2例行PET-CT检查,1例回报胰腺代谢弥漫性增高,1例显示胰腺体尾部代谢弥漫增高并显示胆总管胰腺部代谢增高,延迟显像后降低。

**2.4 治疗与随访** 7例患者中6例(85.7%)给予甲强龙或强的松治疗,1例因合并感染未用激素,仅对症治疗。黄疸严重或血清学指标升高明显者予甲强龙静点冲击治疗(起始剂量为320或160 mg/d,每3 d后复查血清学指标好转剂量减半,当减量至40 mg时改为口服),口服甲强龙或强的松者剂量为30-40 mg/d或0.6 mg/(kg·d),每2 wk复查指标( $\gamma$ 球蛋白、IgG、胆红素等)好转后递减4-8 mg,当减量至4-8 mg时停药或继续小剂量维持。此6例激素治疗均有效:临床症状改善,血清学指标,如 $\gamma$ 球蛋白、IgG、胆红素、淀粉酶、肝功、CA-199等恢复正常或有不同程度下降,影像学(MRCP或CT)显示胰腺肿大程度减轻。AIP合并糖尿病4例,其中1例为既往糖尿病患者,3例继发于自身免疫性胰腺炎,均予胰岛素联合激素治疗,血糖控制良好。

应用激素6例患者中5例进行随访,随访时间4 mo-1年。其中2例未复发(其中1例行ERCP下胆管支架植入术),3例复发。复发病例中,2例激素未用至足够疗程(分别用药7 wk和10 wk)即停药,1例用至足疗程(停药后1年零7 mo)复发。复发病例再次应用激素均有效,其中1例第2次用药至足够疗程后再次复发。4例合并自身免疫性肝病的均复发,其中1例未用激素,1例激素疗程不够(口服甲强龙两个半月即停药,起始剂量32 mg)。

3例患者因黄疸严重或合并感染行ERCP胆总管支架植入术,术后黄疸好转,肝功能、胆红素等指标下降,但因支架脱落或堵塞等原因需反复更换支架,联合足疗程激素治疗者,未见复发。5例使用熊去氧胆酸胶囊250 mg, 2次/d或3次/d治疗,联合激素或甘乐等药物,对症状缓解或血清学异常指标恢复均有良好作用。

### 3 讨论

1995年Yoshida等<sup>[3]</sup>正式提出AIP的概念。1997年由Ito等<sup>[4]</sup>明确提出其诊断标准。2001年,在TIGAR-O慢性胰腺炎危险因素分类系统中,AIP已被作为慢性胰腺炎的一种独立分型而存在<sup>[5]</sup>。AIP多见于中老年男性,本研究显示男女比例为6:1,平均年龄为59.4岁 $\pm$ 10.9岁,与日本报道的平均发病年龄超过55岁<sup>[6]</sup>,男女发病率比例2-5:1<sup>[7,8]</sup>大致相符。

AIP包括原发性和继发性两种。继发性胰腺炎常伴发与胰腺本身病变程度不平行的其他自身免疫系统疾病<sup>[9]</sup>,如干燥综合征、原发性胆汁性肝硬化、肝外胆管硬化症、间质性肺炎等。另有研究表明50%的AIP患者伴有2型糖尿病。本研究中4例确诊为糖尿病,3例并发间质性肺炎,3例并发自身免疫性肝病,1例合并硬化性胆管炎,另1例出现口干眼干等症状并确诊为结缔组织病。提示AIP发病与自身免疫因素相关。与以往报道不同的是,本组7例患者中4例合并胆囊或胆管结石,可能提示胰腺炎的反复发作是AIP发作的危险因素,慢性胰腺炎患者并不能排除合并AIP的可能。

AIP多起病隐匿,临床表现轻微且多无特异性,可表现为:阻塞性黄疸,轻微上腹痛或上腹部不适,体质量减轻,低热,周身不适,腹泻、乏力、恶心、呕吐等胃肠道症状。其中最常见的症状为梗阻性黄疸,其发生机制: IgG4<sup>+</sup>浆细胞、CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup> T细胞大量浸润胰胆管,导致慢性炎症和纤维化,致胰胆管狭窄进而出现梗阻性黄疸。本研究中7例患者均出现梗阻性黄疸(100%),轻度腹痛或上腹不适3例(42.9%),乏力、体质量减轻5例(71.4%),腹泻3例(42.9%),腹胀和食欲减退各2例(28.6%),这与国内外研究一致,7例患者均以梗阻性黄疸为主诉就诊,经影像学检查并完善IgG4等特异指标后确诊,故临床上对疑似AIP的梗阻性黄疸患者应强化完善影像学,血清 $\gamma$ 球蛋白、IgG等指标的检查,以免疏忽漏诊。

AIP的实验室检查可以有以下表现: (1) $\gamma$ 球蛋白增高和/或IgG增高, 尤其是IgG4; (2)自身抗体如ANA、ASMA、抗乳铁蛋白抗体(ALF)、ACA-II阳性, 其中较特异的是ALF和抗碳酸酐酶-II(ACA II); (3)血淀粉酶多正常或稍高于正常; (4)淤胆性肝功能异常: 主要表现为直接胆红素为主的血清胆红素升高, 同时伴有不同程度的转氨酶升高; (5)血糖增高; (6)CA199升高: 约有半数AIP患者的肿瘤标志物(例如CA199)水平可升高但通常低于胰腺癌患者; (7)嗜酸粒细胞增高. 其中血清 $\gamma$ 球蛋白和IgG(特别是IgG4)升高, 被认为是对AIP进行诊断、鉴别诊断、复发监测及治疗效果评价的特征性指标. Hamano等<sup>[10]</sup>报道, 血清IgG4升高诊断AIP的敏感性为95%, 特异性为97%. 本研究中 $\gamma$ 球蛋白增高率达100%, IgG增高率达85.7%, 并且经激素治疗后两者均有不同程度下降. 由于条件限制, 并非所有患者均行IgG4检测, 其中3例于北京行IgG4检查, 结果均显示高于正常实验室参考范围. 目前我院也已经普及IgG亚类检测, 以便更好的进行自身免疫性胰腺炎的临床研究. 自身抗体阳性是AIP实验室检查的另一常见特征, 但由于阳性率较高的ALF和ACA II并不常见于常规实验室检测中, 本研究中缺乏相关证据. 其他在临床工作中常被检验的抗体如ANA、RF、抗SSA/SSB阳性率相对较低, 本研究中显示RF阳性者和AMA阳性者分别为2例(8.6%), ANA阳性者3例(42.9%), 7例患者均进行抗SSA/SSB、SMA检测, 结果均为阴性. 另外, 与以往研究结果不一致的是: 7例患者中嗜酸粒细胞计数和比例均在正常范围内. 就此还需进行大样本资料调查分析, 明确嗜酸性粒细胞升高是否对AIP有临床意义及其机制.

AIP在影像学上主要表现为胰腺弥漫性或局限性肿大, 主胰管和胆总管胰腺段狭窄. 胰管的狭窄部分与胰腺的肿胀部分相一致, 其病理基础是胰管管壁的大量炎症细胞, 特别是淋巴细胞的浸润和纤维化, 病变后期管壁由于纤维化而增厚狭窄<sup>[11]</sup>. 由于肿大胰头压迫、管壁淋巴细胞浸润及纤维化, 胰腺炎症还可累及胆总管胰腺段, 造成管壁增厚及管腔狭窄, 狭窄段以上胆管不同程度扩张<sup>[12]</sup>. 炎症和纤维化累及胰周脂肪组织, 出现围绕胰腺的环形包膜样结构, 也是AIP非常重要的特征<sup>[13]</sup>. 本研究中6例行MRCP均显示胆总管胰腺段狭窄, 并伴有不同程度上游胆道的扩张, 4例行ERCP显示胆总管胰腺段狭窄和主胰管胰头段狭窄, 符合AIP特征性影像学

表现.

日本标准认为组织学是诊断AIP的金标准, 但由于胰腺的特殊性, 获得满意的活检标本较为困难, 胰腺活检在诊断中的作用仍有争议<sup>[14]</sup>. 开腹探查得到的病理结果虽阳性率相对较高但对患者创伤大, 在临床中难以实施, EUS引导下FNA细胞学检查受取材部位等影响, 获取组织量较少, 标本往往不能满足AIP的诊断需求. 在日本标准的基础上, 2008-06推出的亚洲标准将“激素治疗有效”作为重要一项纳入其中, 为AIP的诊断提供了更为明确和统一的指南. 标准指出: 当临床高度怀疑AIP但不能确诊时, 试验性激素治疗有效者也可获得确诊. 激素治疗推荐用药为糖皮质激素, 多推荐起始剂量为30-40 mg/d<sup>[15]</sup>或每日0.6 mg/kg<sup>[16]</sup>, 总疗程6-12 mo<sup>[15]</sup>. 治疗成功的标准是临床症状改善、实验室检查结果好转、内外分泌功能恢复和影像学征象显著改善. 对于黄疸严重或合并感染者可联合ERCP行胆总管支架植入术. 研究表明激素治疗效果良好, 对AIP及AIP继发的II型糖尿病均有显著疗效, 但停药后可能出现复发, 尤其用药疗程不足者或自身免疫肝病者复发率高, 此时小剂量激素(4-8 mg)或优思弗可做维持治疗预防复发. 本研究中6例患者应用激素治疗均有效, 临床症状、血清学指标、影像学均有不同程度改善. 3例行ERCP胆总管支架植入术者, 术后黄疸、实验室指标好转, 联合激素治疗效果良好.

目前自身免疫性胰腺炎已经越来越多的受到临床医务工作者的重视, 其相关科研与临床水平也在逐步提高. 但由于确切发病机制尚不清楚且临床表现缺乏特异性, 其诊断方面仍需进一步完善, 避免不必要的开腹探查术. 治疗方面应保证激素治疗的及时性和足疗程, 并加强随访力度, 对复发者可再次用药并采取维持治疗预防复发.

#### 4 参考文献

- 1 唐令谄, 冯昌宁, 蒋智敏. 原发性自身免疫性胰腺炎1例报道并文献复习. 胰腺病学 2004; 4: 41-42
- 2 Otsuki M, Chung JB, Okazaki K, Kim MH, Kamisawa T, Kawa S, Park SW, Shimosegawa T, Lee K, Ito T, Nishimori I, Notohara K, Naruse S, Ko SB, Kihara Y. Asian diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: consensus of the Japan-Korea Symposium on Autoimmune Pancreatitis. *J Gastroenterol* 2008; 43: 403-408 [PMID: 18600383 DOI: 10.1007/s00535-008-2205-6]
- 3 Yoshida K, Toki F, Takeuchi T, Watanabe S, Shiratori K, Hayashi N. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the

#### ■名词解释

EUS-FNA: 超声内镜引导下细针穿刺活检, 利用超声探头在近距离对病变组织进行实时扫描观察并行细针穿刺活检取得组织标本, 对淋巴结病变及消化道疾病, 如胰腺和直肠周围病变诊治均有重要临床意义.

## ■同行评价

本文主题明确,思路清楚,分析透彻,而且有一段时间的随诊观察,有重要的理论意义和临床应用价值.

- 4 Ito T, Nakano I, Koyanagi S, Miyahara T, Migita Y, Ogoshi K, Sakai H, Matsunaga S, Yasuda O, Sumii T, Nawata H. Autoimmune pancreatitis as a new clinical entity. Three cases of autoimmune pancreatitis with effective steroid therapy. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1458-1468 [PMID: 9246047 DOI: 10.1023/A:1018862626221]
- 5 Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 2001; 120: 682-707 [PMID: 11179244 DOI: 10.1053/gast.2001.22586]
- 6 Fukumori K, Shakado S, Miyahara T, Fukuizumi K, Takemoto R, Nishi H, Sakai H, Muranaka T, Sata M. Atypical manifestations of pancreatitis with autoimmune phenomenon in an adolescent female. *Intern Med* 2005; 44: 886-891 [PMID: 16157994 DOI: 10.2169/internalmedicine.44.886]
- 7 Okazaki K. Autoimmune pancreatitis: etiology, pathogenesis, clinical, findings and treatment. The Japanese experience. *Jop J Pancreas* 2005; 6(1 Suppl): 89
- 8 Kamisawa T, Yoshiike M, Egawa N, Nakajima H, Tsuruta K, Okamoto A. Treating patients with autoimmune pancreatitis: results from a long-term follow-up study. *Pancreatol* 2005; 5: 234-238; discussion 234-238 [PMID: 15855821 DOI: 10.1159/000085277]
- 9 Hamano H, Arakura N, Muraki T, Ozaki Y, Kiyosawa K, Kawa S. Prevalence and distribution of extrapancreatic lesions complicating autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol* 2006; 41: 1197-1205 [PMID: 17287899]
- 10 Hamano H, Kawa S, Horiuchi A, Unno H, Furuya N, Akamatsu T, Fukushima M, Nikaido T, Nakayama K, Usuda N, Kiyosawa K. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med* 2001; 344: 732-738 [PMID: 11236777 DOI: 10.1056/NEJM200103083441005]
- 11 Günter Klöppel, Jutta Lüttges, Bence Sipos, Paola Capelli, Giuseppe Zamboni. Autoimmune pancreatitis: pathological findings. *J Pancreas* 2005; 6: 97-101
- 12 Abraham SC, Cruz-Correa M, Argani P, Furth EE, Hruban RH, Boitnott JK. Lymphoplasmacytic chronic cholecystitis and biliary tract disease in patients with lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 441-451 [PMID: 12657928 DOI: 10.1079/0000478-200304000-00003]
- 13 沈镭, 房静远. 自身免疫性胰腺炎的诊断和治疗进展. *中华消化杂志* 2008; 28: 716-717
- 14 Kwon S, Kim MH, Choi EK. The diagnostic criteria for autoimmune chronic pancreatitis: it is time to make a consensus. *Pancreas* 2007; 34: 279-286 [PMID: 17414049 DOI: 10.1097/MPA.0b013e31802eff5f]
- 15 Ito T, Nishimori I, Inoue N, Kawabe K, Gibo J, Arita Y, Okazaki K, Takayanagi R, Otsuki M. Treatment for autoimmune pancreatitis: consensus on the treatment for patients with autoimmune pancreatitis in Japan. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 18: 50-58 [PMID: 17520224]
- 16 Kamisawa T, Shimosegawa T, Okazaki K, Nishino T, Watanabe H, Kanno A, Okumura F, Nishikawa T, Kobayashi K, Ichiya T, Takatori H, Yamakita K, Kubota K, Hamano H, Okamura K, Hirano K, Ito T, Ko SB, Omata M. Standard steroid treatment for autoimmune pancreatitis. *Gut* 2009; 58: 1504-1507 [PMID: 19398440 DOI: 10.1136/gut.2008.172908]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

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



# KAP-1在胰腺癌中的表达及临床意义

江建新, 詹磊, 黄洋, 何燕浙, 孙诚谊

江建新, 詹磊, 黄洋, 何燕浙, 孙诚谊, 贵阳医学院附属医院肝胆外科 贵州省贵阳市 550001

江建新, 副主任医师, 主要从事肝胆胰脾疾病的基础与临床研究。国家自然科学基金资助项目, No. 81160311

贵州省科教青年英才培养工程基金资助项目, No. 黔省专合字[2012]177号

贵州省科技厅2011年度社会攻关计划基金资助项目, No. 黔科合SY字[2011] 3007

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

作者贡献分布: 主要实验设计、资料收集分析、统计及文章撰写由江建新完成; 文章修改与审阅由孙诚谊完成; 样本处理、实验操作由詹磊、黄洋及何燕浙完成。

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

收稿日期: 2013-01-19 修回日期: 2013-02-18

接受日期: 2013-02-26 在线出版日期: 2013-03-28

## Clinical significance of expression of KAP-1 in pancreatic carcinoma

Jian-Xin Jiang, Lei Zhan, Yang Huang, Yan-Zhe He, Cheng-Yi Sun

Jian-Xin Jiang, Lei Zhan, Yang Huang, Yan-Zhe He, Cheng-Yi Sun, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550001, Guizhou Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81160311; the Outstanding Young Training Project of Science and Education of Guizhou Province, No. [2012]177; the Foundation of Science and Technology Department of Guizhou Province, No. [2011] 3007; and the Project of Liver and Pancreatic Diseases Technological Innovation Talent Team of Guizhou Province, No. [2010]4010

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

Received: 2013-01-19 Revised: 2013-02-18

Accepted: 2013-02-26 Published online: 2013-03-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of KAP-1 in pancreatic carcinoma.

**METHODS:** The expression of KAP-1 protein in 46 pancreatic cancer specimens (including 15 cases of highly differentiated cancer, 17 cases of moderately differentiated cancer, and 14 cases of poorly differentiated cancer) and 9 normal pancreas specimens was detected by immuno-

histochemistry. The mRNA and protein expression of KAP-1 in 8 cases of pancreatic cancer and matched tumor-adjacent pancreatic tissue and in pancreatic carcinoma cell lines (BxPC3, CAPAN-1, PANC-1, AsPC-1, SW1990, MiaPaCa-2 and CFPAC-1) was also detected by RT-qPCR and Western blot.

**RESULTS:** The positive rate of KAP-1 expression was 45.6% (21/46) in pancreatic cancer and 11.1% (1/9) in normal pancreatic tissue, and was 78.6% (11/14) in poorly differentiated pancreatic cancer, 47.1% (8/17) in moderately differentiated pancreatic cancer, and 13.3% (2/15) in highly differentiated pancreatic cancer. The mRNA and protein expression of KAP-1 was higher in pancreatic cancer than in matched tumor-adjacent pancreatic tissue. The mRNA expression of KAP-1 was highest in poorly differentiated pancreatic cancer line Panc-1, higher in BxPC-3 and CFPAC-1, lower in SW1990, Capan-1 and MIAPaCa-2, and lowest in AsPC-1 and Capan-2. The protein expression of KAP-1 was highest in poorly differentiated pancreatic cancer line MIAPaCa-2 and Panc-1, higher in CFPAC-1 which is derived from liver metastases of pancreatic cancer cell, and was undetectable in other cell lines.

**CONCLUSION:** The expression of KAP-1 in human pancreatic cancer tissue is significantly higher than that in normal pancreatic tissue, and KAP-1 expression is involved in pancreatic cancer cell differentiation. KAP-1 may play an important role in the development of pancreatic cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Pancreatic carcinoma; KAP-1; Differentiation

Jiang JX, Zhan L, Huang Y, He YZ, Sun CY. Clinical significance of expression of KAP-1 in pancreatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 829-834 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/829.asp>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.829>

## 摘要

**目的:** 研究KAP-1在胰腺癌组织和细胞株中的

## ■背景资料

胰腺癌的早期转移、对传统的治疗抵抗以及较易复发是其致死的关键因素,胰腺癌干细胞具有不同分化潜能,以及侵袭转移和治疗抵抗能力。

## ■同行评议者

肖恩华,教授,中南大学湘雅二医院放射教研室;郭俊明,教授,宁波大学医学院生物化学与分子生物学研究所

## ■研究前沿

KAP-1在胰腺癌组织及胰腺癌细胞系中的表达和作用未见文献报道。本文初步研究表明KAP-1在胰腺癌组织中高表达,正常胰腺组织中几乎不表达,其表达与胰腺癌细胞分化相关;为后续的探讨KAP-1在胰腺癌干细胞中的作用及其作用机制研究奠定基础。

## 表达及意义

**方法:**采用免疫组织化学方法检测46例胰腺癌标本(高分化15例,中分化17例,低分化14例)及9例正常胰腺标本中的KAP-1表达;采用RT-qPCR和Western blot的方法检测8对胰腺癌组织和配对癌旁组织标本中KAP-1的mRNA和蛋白质水平;采用RT-qPCR和Western blot检测胰腺癌细胞株BxPC3、PANC-1、AsPC-1、SW1990、MIAPaCa-2、CFPAC-1、Capan-1和Capan-2中KAP-1 mRNA和蛋白的表达水平。

**结果:**免疫组织化学结果显示KAP-1在胰腺癌组织中阳性表达率为45.6%(21/46例),正常胰腺组织中阳性表达率为11.1%(1/9);在低分化胰腺癌组织中阳性表达率为78.6%(11/14),中分化胰腺癌组织为47.1%(8/17),高分化胰腺癌组织为13.3%(2/15);RT-qPCR和Western blot显示在胰腺癌组织中KAP-1的mRNA和蛋白质水平较癌旁正常胰腺组织高,KAP-1的mRNA水平在Panc-1中最高,在BxPC-3和CFPAC-1中较高,在SW1990、Capan-1和MIAPaCa-2中较低,在AsPC-1和Capan-2中最低。KAP-1蛋白质水平在低分化胰腺癌细胞株MIAPaCa-2和Panc-1中高,来源于肝转移的胰腺癌细胞系CFPAC-1中较高,其余细胞株中不表达。

**结论:**KAP-1在胰腺癌组织中高表达,正常胰腺组织中几乎不表达,其表达与胰腺癌细胞分化相关;KAP-1可能在胰腺癌发生发展中发挥重要作用。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:**胰腺癌; KAP-1; 分化

江建新, 詹磊, 黄洋, 何燕浙, 孙诚谊. KAP-1在胰腺癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 829-834 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/829.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.829>

## 0 引言

胰腺癌是高度恶性、预后最差的恶性肿瘤之一,其5年生存率不到5%<sup>[1]</sup>。大多数患者因确诊时伴有局部和/或远处的侵袭、转移而丧失手术时机<sup>[2]</sup>,即使临床手术根治性切除的胰腺癌患者术后也大多数因出现复发和远处转移预后极差,其原因为术前就有微转移灶形成及其化疗抵抗<sup>[3]</sup>,胰腺癌的早期转移、对传统的治疗抵抗以及较易复发是其致死的关键因素。肿瘤干细胞理

论解释了上述现象。胰腺癌干细胞研究表明<sup>[4]</sup>:在原发肿瘤里存在一个亚群细胞,这群细胞具有自我更新、分化潜能以及在异位重新成瘤能力。同时,这群细胞还具有侵袭转移和化疗抵抗特性。最新的研究表明:胰腺癌在形成之前通过上皮-间质转化(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)形成胰腺癌干细胞,是其早期发生转移,治疗抵抗,复发的根本原因<sup>[5]</sup>。我们前期依据文献以MIA-PaCa2(TIC<sup>high</sup>)与BxPc-3(TIC<sup>low</sup>)作为研究胰腺癌干细胞的工具细胞<sup>[6]</sup>,通过蛋白质组学筛选胰腺癌干细胞相关差异蛋白,发现KAP-1(KAP-1, KRAB-associated protein 1, TRIM28, tripartite motif-containing 28, TIF1 $\beta$ )在前者表达较后者高10倍多,并通过检索文献提示KAP-1与EMT和干细胞的“干性”相关<sup>[7]</sup>。KAP-1是一个97 kDa的核磷蛋白。人KAP-1基因位于19号染色体,位置是19q13.4,共16个外显子。小鼠KAP-1基因位于7号染色体,位置是7A2,共17个外显子。KAP-1具有TIF1家族中常见的保守结构域: N端的RBCC(RING-B box-coiled-coil)结构域、C端保守的PHD型锌指和紧随其后的Bromodomain(BrD)结构域,中部是该家族内保守度最低的区域,一般情况下富含脯氨酸,甘氨酸和丝氨酸<sup>[8]</sup>。为了进一步研究KAP-1在胰腺癌及胰腺癌干细胞中的作用,我们首先检测KAP-1在胰腺癌组织和细胞株中的表达,探讨其可能的临床意义。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胰腺癌细胞系PANC-1、AsPC-1、SW1990、MIA-PaCa2、CFPAC-1、BxPC3、Capan-1以及Capan-2购自American Tissue Culture Collection(ATCC); 兔抗人TIF1 $\beta$ 单克隆抗体购自美国Cell Signaling公司; 小鼠抗 $\beta$ -actin单克隆抗体购自美国Abcam公司; 荧光定量PCR仪为美国Bio-Rad公司(型号: CFX96); DAB显色试剂盒(武汉百奥斯生物科技有限公司); SP免疫组织化学试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学法检测KAP-1在胰腺癌组织中的表达:** 46例胰腺癌标本(高分化15例,中分化17例,低分化14例)及9例正常胰腺标本取自本院接受胰十二指肠切除和胰体尾部切除术住院患者术后的胰腺癌和正常胰腺组织石蜡块标本。均经常规病理检查证实为胰腺癌,包括胰头部32例、胰尾部14例; 男36例,女20例,年龄36-68

岁(中位年龄52岁)。手术标本经5  $\mu$ m厚连续切片, 脱腊、脱水、高温修复抗原、3%双氧水和山羊血清封闭非特异性蛋白后, TIF1 $\beta$ 的免疫组织化学染色行链霉素亲和素-过氧化酶复合物法(SP法), TIF1 $\beta$  mAb工作液浓度为1:100, 实验程序严格按照说明书进行, PBS代替一抗作为阴性对照。结果判断每张切片在400倍光学显微镜下连续找10个视野, 每个视野计数50个肿瘤细胞。KAP-1阳性判断标准以肿瘤细胞内出现棕黄色染色为阳性。免疫组织化学结果以阳性细胞数所占百分比来表示, 考虑到KAP-1阳性染色的肿瘤细胞较少, 只要在肿瘤细胞中发现KAP-1的阳性染色则判断为KAP-1阳性表达细胞<sup>[9]</sup>。

**1.2.2 RT-qPCR检测KAP-1的mRNA表达:** 上述8种胰腺癌细胞株按照ATCC提供的培养条件, 进行细胞培养。按照试剂盒说明书进行操作, 提取8例胰腺癌和癌旁组织以及8种胰腺癌细胞株的总mRNA、去除基因组DNA并合成cDNA后; 根据实时定量PCR试剂盒说明书进行加样。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min, 95  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸30 s, 45个循环。实验重复3次。由随机附带软件LCS480 1.5.039计算Ct值和拷贝数, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对其进行计算分析( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法以管家基因GAPDH为参照基因, 以BXPC-3样本数据为校准样本, 其他细胞株Ct值与之相比较, 相对分析mRNA表达水平), 其中KAP-1引物: 上游5'-AAGTCTCGGGATGGTGAACG-3', 下游: 5'-CAGACACCTGGCGGATTGA-3', 长度262 bp; GAPDH引物: 上游: 5'-TGACTTCAACAGC-GACACCA-3', 下游: 5'-CACCTGTTGCTGTAGCCAAA-3', 长度121 bp。(引物序列由软件Beacon designer 7设计, 上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。

**1.2.3 Wsetern blot检测KAP-1的蛋白表达:** 上述8种胰腺癌细胞株按照ATCC提供的培养条件, 进行细胞培养。分别提取上述8例胰腺癌和配对癌旁组织以及8种胰腺癌细胞株的总蛋白; 将提取的蛋白质样本按每孔30  $\mu$ g上样于12% SDS-PAGE后进行电泳; 用电转移法转移蛋白质至PVDF膜, 然后用5%脱脂奶粉封闭膜1 h。加入小鼠抗TIF1 $\beta$ 单克隆抗体(1:600)后4  $^{\circ}$ C孵育过夜, 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠IgG孵育1 h。参照免疫印迹化学发光试剂盒说明进行化学发光法显示结果, X线胶片曝光。实验重复3次, 条带密度采用QuantityOne Program(Bio-Rad)软件进行分析。目的蛋

白的相对表达水平 = 目的蛋白的灰度值/ $\beta$ -actin蛋白的灰度值, 取3次平均值。采用GAPDH为参照。

**统计学处理** 采用SPSS17.0对数据进行统计, 计数资料采用两个或多个样本的 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 免疫组织化学检测KAP-1在胰腺癌组织中的表达** KAP-1主要为核表达, 在胰腺癌组织中性表达率为45.6%(21/46例), 正常胰腺组织中性表达率为11.1%(1/9例); 在低分化胰腺癌组织中阳性表达率为78.6%(11/14例), 中分化胰腺癌组织为47.1%(8/17例), 高分化胰腺癌组织为13.3%(2/15例)(图1), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 RT-qPCR、Wsetern blot检测8例胰腺癌和癌旁组织KAP-1的mRNA和蛋白表达** RT-qPCR检测结果显示: KAP-1的mRNA在8对胰腺癌和癌旁组织中, 前者表达水平显著高于后者(图2,  $P < 0.05$ )。Wsetern blot检测结果显示: KAP-1的蛋白在胰腺癌中表达较配对癌旁组织显著增高(图3)。

**2.3 RT-qPCR、Wsetern blot检测8种胰腺癌细胞株KAP-1的mRNA和蛋白表达** KAP-1的mRNA在上述8种胰腺癌细胞株的水平由高到低依次为PANC-1、BxPC3、CAPAN-1、SW1990、MiaPaCa-2、AsPC-1、CAPAN-2(图4)。KAP-1的蛋白表达在低分化胰腺癌细胞株MIA PaCa-2和Panc-1中高, 来源于肝转移的胰腺癌细胞系CF-PAC-1中表达较高, 其余细胞系中不表达(图5)。

## 3 讨论

KAP-1是一种转录中介因子, 在诸多转录调控复合体中起桥梁作用<sup>[8]</sup>。他通过其N端RBCC结构域与含KRAB结构域的锌指蛋白、MDM2、MM1、C/EBP $\beta$ 等相互作用; 通过C端的PHD及BrD结构域与SETDB1、Mi-2 $\alpha$ 等分子相互作用, 参与形成具有组蛋白甲基化酶或组蛋白去乙酰化酶活性的复合体; 通过中间的HP1BD区域与HP1蛋白相互作用, 进而与组蛋白相结合。许多研究表明, KAP-1在肿瘤细胞中高表达。Ho等<sup>[10]</sup>采用蛋白质组学技术筛选KAP-1在乳腺癌中高表达, 且与乳腺癌侵袭转移相关。Yokoe等<sup>[11]</sup>证实KAP-1在胃癌中高表达, 且和胃癌的腹腔播散及不良预后相关。研究也表明KAP-1是维持干细胞的“干性”关键基因之一。Hu等<sup>[12]</sup>

### ■ 相关报道

Ho等采用蛋白质组学技术证明KAP-1在乳腺癌中高表达, 且与乳腺癌侵袭转移相关。Takeshi等证实KAP-1在胃癌中高表达, 且和胃癌的腹腔播散及不良预后相关。Bingnan等发现KAP-1与化疗耐药相关, 且KAP-1的Ser824发生磷酸化。



## ■创新盘点

本研究检测不同分化程度的临床胰腺癌标本和8种不同分化程度的胰腺癌细胞系中KAP-1的表达水平,探讨其在胰腺癌与癌旁的表达以及与胰腺癌细胞分化的关系。

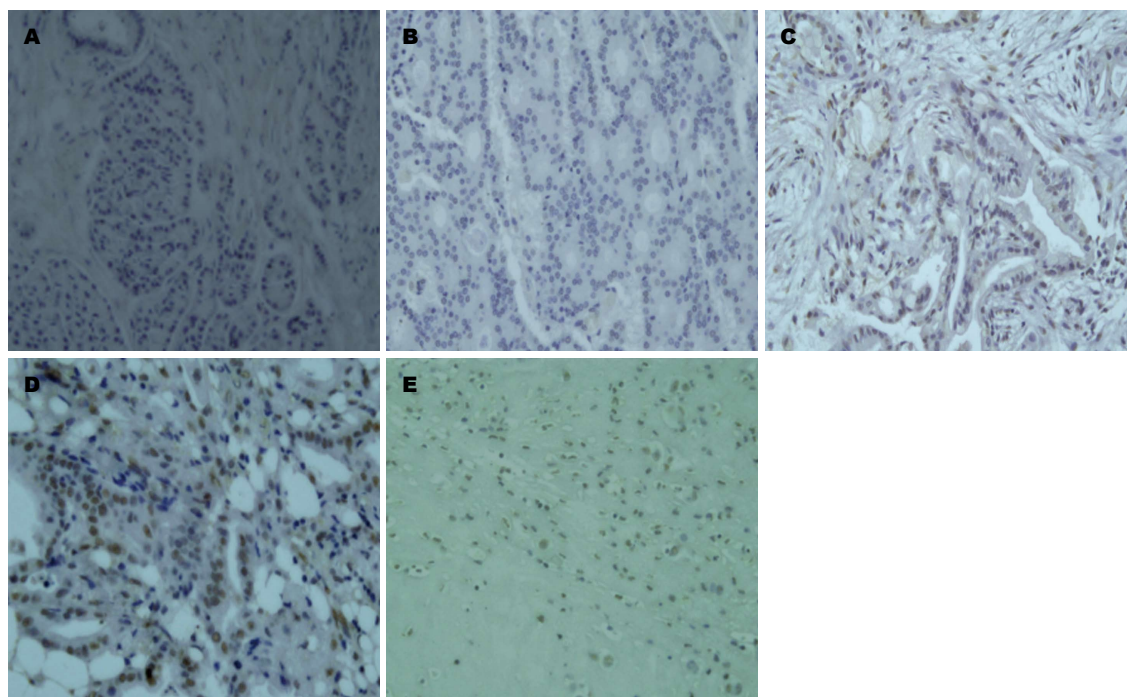


图1 免疫组织化学检测KAP-1在不同分化胰腺癌组织和正常胰腺组织中的表达( $\times 40$ )。A: 阴性对照组; B: 正常胰腺组织; C: 高分化胰腺癌组织; D: 中分化胰腺癌组织; E: 低分化胰腺癌组织。

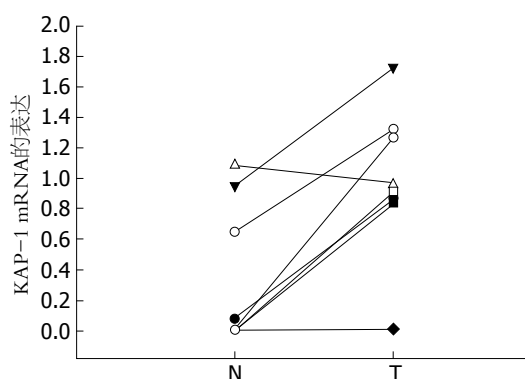


图2 RT-qPCR检测8例胰腺癌和癌旁组织中KAP-1 mRNA的表达。N: 癌旁组织; T: 胰腺癌组织。

研究表明KAP-1在胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)和胚胎组织中高表达,在ES分化组织中表达下调,在胰腺组织中表达极低;RNAi抑制KAP-1的表达能增加分化细胞的百分率。采用Trim28 ChIP证实KAP-1通过靶向具有多向分化潜能性基因Cnot3、Nanog、Sox2、Tcf3、Il6st和Lefty2启动子区域调节其表达(Trim28-binding sites: GCCGCGXX),从而维持干细胞的自我更新能力,是ES自我更新的关键基因之一。Fazzio等<sup>[13]</sup>的研究也证实了KAP-1在ES的“干性”维持方面发挥重要作用。Wolf等<sup>[14]</sup>研究表明: F9胚胎癌细胞(Embryonal carcinoma, EC)发生分化时, KAP-1的表达水平下调; RNAi抑制KAP-1

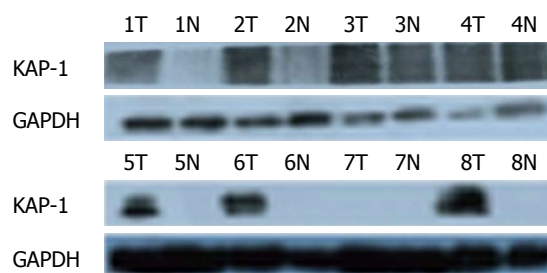


图3 Western blot检测8例胰腺癌和癌旁组织中KAP-1的蛋白表达。N: 癌旁组织; T: 胰腺癌组织。

的表达, F9 EC和JM1 ES生长抑制, 细胞发生分化。Seki等<sup>[15]</sup>研究证实: KAP-1能改变ES的多向分化潜能或是分化状态, 是这两种状态的临界关卡点。KAP-1在具有多向分化潜能的鼠ES高表达; RNAi抑制KAP-1的表达, 鼠ES显示分化状态。此外, 磷酸化的KAP-1和特异性多向分化潜能转录因子Oct3/4形成复合物, 能抑制ES的分化, 维持其多向分化潜能, 诱导iPS细胞(诱导多能干细胞iPS Cell)。Cammass等<sup>[16]</sup>也证实了KAP-1在F9 EC分化中的作用。此外, KAP-1参与EMT发生, 与肿瘤的侵袭转移、化疗耐药相关。Venkov等<sup>[17]</sup>以SJL/J小鼠肾近端小管上皮细胞株MCT(mIMCD)为研究对象, 采用凝胶迁移或电泳迁移率实验和DNA亲和层析法及后续的质谱分析, 在纤维母细胞特异性蛋白1(fibroblast specific protein 1, FSP1)的近端顺式作用子元件

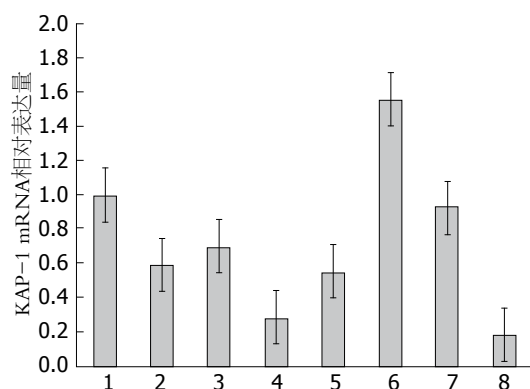


图4 RT-qPCR检测8种胰腺癌细胞株中KAP-1的mRNA相对表达量(以BXPc-3样本数据为校准样本). 1: BXPc-3; 2: SW1990; 3: Capan-1; 4: ASPC-1; 5: MIAPaCa-2; 6: Panc-1; 7: CFPAC-1; 8: Capan-2.

域绑定的蛋白复合物中鉴定出两个蛋白质, 分别为CBF-A和KAP-1. FSP1在人肿瘤细胞中称为S100A4, 在EMT发挥重要作用; S100A4能增加肿瘤细胞的运动和侵袭能力, 导致转移瘤的发生. 最近有研究表明<sup>[18]</sup>: 在人畸胎瘤细胞系NTera2D1中, KAP-1能在mRNA水平上激活许多EMT相关基因, 如ACTA2、S100A4、SNAI2、TJP1、TJP2、TWIST1、VIM等. KAP-1与乳腺癌的侵袭转移相关<sup>[10]</sup>. Han等<sup>[19]</sup>比较结肠癌细胞株HCT-116(具有结肠癌干细胞特性, 对化疗药NSC 724998不敏感)和恶性黑色素瘤细胞株A375(对化疗药NSC 724998敏感)NSC 724998处理前后不同蛋白质表达的变化, 发现KAP-1在治疗后的表达上调, 且KAP-1的Ser824发生磷酸化. 上述这些研究充分表明KAP-1不仅在肿瘤的发生发展中发挥重要作用, 而且与肿瘤干细胞及其生物学功能密切相关.

我们的实验结果显示KAP-1在胰腺癌组织中高表达, 正常胰腺组织中几乎不表达; 在低分化胰腺癌组织中表达最高, 中分化胰腺癌组织中表达较高, 高分化胰腺癌组织中低表达; 这表明KAP-1在胰腺癌的发生发展过程中可能发挥重要作用, 与胰腺癌细胞分化相关. 我们的RT-qPCR、Western blot检测8例胰腺癌和配对癌旁组织中KAP-1的mRNA和蛋白表达结果也证实了上述结果. 在不同分化的细胞系中, KAP-1的蛋白表达在未分化或低分化胰腺癌细胞株MIAPaCa-2和Panc-1中高, 来源于肝转移的胰腺癌细胞系CFPAC-1中表达较高, 其余细胞系中不表达. 这也表明KAP-1与胰腺癌细胞的分化相关. KAP-1的mRNA表达在Panc-1中表达最高, 在BXPc-3和CFPAC-1中较高, 在SW1990、Ca-

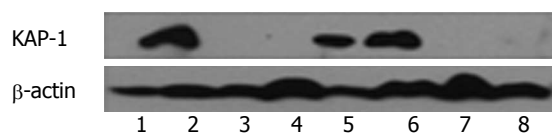


图5 Western blot检测8种胰腺癌细胞株中KAP-1的蛋白相对表达量. 1: BXPc-3; 2: Panc-1; 3: ASPC-1; 4: SW1990; 5: CFPAC-1; 6: MIAPaCa-2; 7: Capan-1; 8: Capan-2.

pan-1和MIAPaCa-2中较低, 在ASPC-1和Capan-2中最低. 这表明KAP-1的蛋白表达可能还受转录后调控. 此外, 我们的研究也表明在具有多药耐药和EMT特性的胰腺癌细胞株MIA-PaCa2、Panc-1中<sup>[20]</sup>KAP-1高表达, 而在多药敏感, 且不具有EMT特性的胰腺癌细胞株BxPc-3、Capan-1及Capan-2中无表达. 由于胰腺癌干细胞具有多药耐药和EMT特性, 这也从一个侧面提示KAP-1与胰腺癌干细胞相关.

总之, KAP-1在胰腺癌细胞中高表达, 其表达与胰腺癌细胞的分化相关, KAP-1作为一种转录中介因子, 在诸多转录调控复合体中所起的桥梁作用可能和胰腺癌干细胞“干性”维持相关. 探讨KAP-1的生物学功能及其调控机制, 有助于揭示胰腺癌的发生机制, 发现新的胰腺癌治疗靶点.

#### 4 参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29 [PMID: 22237781 DOI: 10.3322/caac.20138]
- 2 Tuveson DA, Neoptolemos JP. Understanding metastasis in pancreatic cancer: a call for new clinical approaches. *Cell* 2012; 148: 21-23 [PMID: 22265397 DOI: 10.1016/j.cell.2011.12.021]
- 3 Lim KH, Chung E, Khan A, Cao D, Linehan D, Ben-Josef E, Wang-Gillam A. Neoadjuvant therapy of pancreatic cancer: the emerging paradigm? *Oncologist* 2012; 17: 192-200 [PMID: 22250057 DOI: 10.1634/theoncologist.2011-0268]
- 4 Rasheed ZA, Matsui W. Biological and clinical relevance of stem cells in pancreatic adenocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27 Suppl 2: 15-18 [PMID: 22320910 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.07015.x]
- 5 Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* 2012; 148: 349-361 [PMID: 22265420 DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.025]
- 6 Kallifatidis G, Rausch V, Baumann B, Apel A, Beckermann BM, Groth A, Mattern J, Li Z, Kolb A, Moldenhauer G, Altevogt P, Wirth T, Werner J, Schemmer P, Büchler MW, Salnikov AV, Herr I. Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF-kappaB-induced antiapoptotic signaling. *Gut* 2009; 58: 949-963 [PMID: 18829980 DOI: 10.1136/gut.2008.149039]

#### ■应用要点

研究KAP-1在胰腺癌组织和细胞系中表达与意义, 为后续探讨KAP-1在胰腺癌干细胞中的作用及其作用机制研究奠定基础.

## ■同行评价

本文研究创新性较好,具有一定的指导意义.

- 7 江建新, 高珊, 潘耀振, 孙诚谊. 蛋白组学分析胰腺癌干细胞相关差异蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2013; 21: 145-152
- 8 Yang D, Jiang Y, He FC. [KAP-1, a scaffold protein in transcription regulation]. *Yi Chuan* 2007; 29: 131-136 [PMID: 17369165]
- 9 殷涛, 王春友, 熊炯炘, 陶京, 赵刚. Vimentin在胰腺癌细胞中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3822-382
- 10 Ho J, Kong JW, Choong LY, Loh MC, Toy W, Chong PK, Wong CH, Wong CY, Shah N, Lim YP. Novel breast cancer metastasis-associated proteins. *J Proteome Res* 2009; 8: 583-594 [PMID: 19086899 DOI: 10.1021/pr8007368]
- 11 Yokoe T, Toiyama Y, Okugawa Y, Tanaka K, Ohi M, Inoue Y, Mohri Y, Miki C, Kusunoki M. KAP1 is associated with peritoneal carcinomatosis in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 821-828 [PMID: 19898899 DOI: 10.1245/s10434-009-0795-8]
- 12 Hu G, Kim J, Xu Q, Leng Y, Orkin SH, Elledge SJ. A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal. *Genes Dev* 2009; 23: 837-848 [PMID: 19339689 DOI: 10.1101/gad.1769609]
- 13 Fazio TG, Huff JT, Panning B. An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell* 2008; 134: 162-174 [PMID: 18614019 DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.031]
- 14 Wolf D, Goff SP. TRIM28 mediates primer binding site-targeted silencing of murine leukemia virus in embryonic cells. *Cell* 2007; 131: 46-57 [PMID: 17923087 DOI: 10.1016/j.cell.2007.07.026]
- 15 Seki Y, Kurisaki A, Watanabe-Susaki K, Nakajima Y, Nakanishi M, Arai Y, Shiota K, Sugino H, Asashima M. TIF1beta regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 10926-10931 [PMID: 20508149 DOI: 10.1073/pnas.0907601107]
- 16 Cammas F, Herzog M, Lerouge T, Chambon P, Losson R. Association of the transcriptional corepressor TIF1beta with heterochromatin protein 1 (HP1): an essential role for progression through differentiation. *Genes Dev* 2004; 18: 2147-2160 [PMID: 15342492 DOI: 10.1101/gad.302904]
- 17 Venkov CD, Link AJ, Jennings JL, Plieth D, Inoue T, Nagai K, Xu C, Dimitrova YN, Rauscher FJ, Neilson EG. A proximal activator of transcription in epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007; 117: 482-491 [PMID: 17273560 DOI: 10.1172/JCI29544]
- 18 Iyengar S, Ivanov AV, Jin VX, Rauscher FJ, Farnham PJ. Functional analysis of KAP1 genomic recruitment. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 1833-1847 [PMID: 21343339 DOI: 10.1128/MCB.01331-10]
- 19 Han B, Stockwin LH, Hancock C, Yu SX, Hollingshead MG, Newton DL. Proteomic analysis of nuclei isolated from cancer cell lines treated with indenoloquinoline NSC 724998, a novel topoisomerase I inhibitor. *J Proteome Res* 2010; 9: 4016-4027 [PMID: 20515076 DOI: 10.1021/pr100194d]
- 20 Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, Gallick GE, Logsdon CD, McConkey DJ, Choi W. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 5820-5828 [PMID: 19584296 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2819]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



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

## • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号.如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>.文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和World Journal of Gastroenterology(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊:序号,作者(列出全体作者).文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页.



# EphA3在结肠癌组织中的表达及临床意义

于泳, 窦科峰, 王家林, 李霄, 王建锋, 韩炜, 张卓超, 阮柏, 王德盛

于泳, 窦科峰, 李霄, 王建锋, 韩炜, 张卓超, 阮柏, 王德盛, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科 陕西省西安市 710032

王家林, 武警陕西省总队医院肝胆胸外科 陕西省西安市 710054

作者贡献分布: 此课题由于泳、窦科峰、王家林及王德盛设计; 研究过程由于泳、李霄、王建锋、韩炜、张卓超及阮柏完成; 此研究所用试剂及经费由王德盛提供; 数据分析由于泳完成; 本论文写作由于泳完成。

通讯作者: 王德盛, 教授, 710032, 陕西省西安市长乐西路126号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆胰脾外科。

yyhys2011@163.com

收稿日期: 2013-01-28 修回日期: 2013-02-20

接受日期: 2013-03-15 在线出版日期: 2013-03-28

## Clinical significance of expression of EphA3 in colon cancer

Yong Yu, Ke-Feng Dou, Jia-Lin Wang, Xiao Li, Jian-Feng Wang, Wei Han, Zhuo-Chao Zhang, Bai Ruan, De-Sheng Wang

Yong Yu, Ke-Feng Dou, Xiao Li, Jian-Feng Wang, Wei Han, Zhuo-Chao Zhang, Bai Ruan, De-Sheng Wang, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Jia-Lin Wang, Department of Hepatobiliary and Thoracic Surgery, Shaanxi Armed Police Corps Hospital, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Correspondence to: De-Sheng Wang, Professor, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University of Chinese PLA, 126 Changle West Road, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. yyhys2011@163.com

Received: 2013-01-28 Revised: 2013-02-20

Accepted: 2013-03-15 Published online: 2013-03-28

## Abstract

**AIM:** To investigate the significance of expression EphA3 protein in colon cancer and the correlation between EphA3 expression and tumor angiogenesis.

**METHODS:** Immunohistochemistry was used to examine EphA3 expression in 108 surgically resected colon cancer specimens and 15 normal colon mucosal tissue specimens. Microvessel density (MVD) in colon cancer was determined after immunostaining for CD31, and the correlation between EphA3 expression and MVD in co-

lon cancer was assessed. The clinical and pathological significance and the prognosis of patients were analyzed using statistical methods.

**RESULTS:** Expression of EphA3 protein in cancer tissue was significantly higher than that in normal colon mucosa tissue. MVD was significantly correlated with overexpression of EphA3, and high MVD was present in tumor areas that were strongly positive for EphA3. Overexpression of EphA3 protein was correlated with tumor size (71.8% vs 28.2%), TMN stages (I: 25.0% vs 75.0%; II: 67.9% vs 32.%; III: 86.5% vs 13.5%; IV: 90.9% vs 9.1%), differentiation grade (low differentiation: 90.0% vs 10.0%; moderate differentiation: 62.5% vs 37.5%; high differentiation: 37.5% vs 62.5%), lymph node metastasis (94.1% vs 5.9%) and distant metastasis (75.0% vs 25.0%), but not with patient age or sex.

**CONCLUSION:** There is a correlation between EphA3 protein overexpression and tumor infiltration and poor prognosis of colon cancer.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Colon cancer; EphA3; Angiogenesis; Microvessel density

Yu Y, Dou KF, Wang JL, Li X, Wang JF, Han W, Zhang ZC, Ruan B, Wang DS. Clinical significance of expression of EphA3 in colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 835-839 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/835.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.835>

## 摘要

**目的:** 探讨酪氨酸蛋白激酶受体EphA3在结肠癌组织中的表达与结肠癌微血管生成之间的关系以及临床意义。

**方法:** 应用免疫组织化学法检测108例结肠癌组织和15例正常结肠组织中EphA3蛋白的表达情况, 同时使用CD31染色检测肿瘤微血管密度(microvessels density, MVD), 并分析EphA3与MVD的关系及其与病理分期、预后的关系。

## ■背景资料

酪氨酸蛋白激酶受体EphA3参与肾癌、肝癌、黑色素瘤和肉瘤的发生、血管生成、肿瘤转移和侵袭, 然而在实体肿瘤结肠癌中的研究很少, 结肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 因此研究结肠癌发生、肿瘤血管生成、转移与侵袭相关分子机制具有重要意义。

## ■同行评议者

刘宝林, 教授, 中国医科大学附属盛京医院

## ■研发前沿

EphA异常表达与多种肿瘤密切相关,其中EphA1、2、4、7在结肠癌组织中异常表达与肿瘤发生、转移和患者生存率密切相关。EphA3在肝癌、肾癌、黑色素瘤和肉瘤组织中高表达,与肿瘤的发生、转移侵袭密切相关。

结果: EphA3蛋白在癌组织中的表达明显高于正常结肠黏膜组织( $P<0.001$ ), 而且EphA3阳性表达强度高的肿瘤区域有较高的微血管密度( $P<0.001$ )。EphA3蛋白高表达与肿瘤大小[51(71.8%) vs 20(28.2%)], TMN分期[I: 8 (25.0%) vs 24(75.0%); II: 19(67.9%) vs 9 (32.1%); III: 32(86.5%) vs 5(13.5%); IV: 10(90.9%) vs 1(9.1%)], 分化[低分化: 18 (90.0%) vs 2(10.0%); 中分化: 45(62.5%) vs 27(37.5%); 高分化: 6(37.5%) vs 10(62.5%)], 淋巴结转移[64(94.1%) vs 4(5.9%)]及远处转移[42(75.0%) vs 14(25.0%)]相关, 而与患者年龄和性别差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

结论: EphA3蛋白的高表达与结肠癌的发生、浸润以及患者预后密切相关。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 结肠癌; EphA3; 血管生成; 微血管密度

于泳, 晏科峰, 王家林, 李霄, 王建锋, 韩炜, 张卓越, 阮柏, 王德盛. EphA3在结肠癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 835-839 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/835.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.835>

## 0 引言

EphA(erythropoietin-producing hepatocellular 3)是重要的酪氨酸激酶受体家族成员之一, EphA不仅参与胚胎发育、血管形成和神经分化, 而且在肿瘤发生、发展和转移中也发挥重要作用<sup>[1]</sup>。目前研究表明EphA异常表达与胃癌、肝癌和胰腺癌的转移、预后密切相关<sup>[2]</sup>, 而其中EphA1、2、4、7在结肠癌组织中异常表达与肿瘤发生、转移和患者生存率密切相关<sup>[3-6]</sup>。研究表明EphA3在肾癌、肝癌、黑色素瘤和肉瘤中均高表达<sup>[7]</sup>, 然而EphA3在实体肿瘤尤其是结肠癌中研究相对较少, 而且各研究结果相互矛盾<sup>[8,9]</sup>。结肠癌是消化系的最常见恶性肿瘤之一, 世界范围内结肠癌的发病率和死亡率均居恶性肿瘤的第3位, 寻找肿瘤相关基因进行干预是预防、治疗结肠癌的新思路, 本研究通过免疫组织化学方法检测EphA3在人结肠癌组织中的表达情况, 并探讨EphA3表达水平与患者肿瘤微血管生成以及患者临床资料之间的关系, 希望给结肠癌的诊治提供新的靶点。

## 1 材料和方法

1.1 材料 108例结肠癌组织标本取自2010-01-2012-

01在我院手术治疗中患者癌组织, 15例正常结肠黏膜组织取自在此期间外伤患者结肠组织, 所有标本经过40 g/L的甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 常规切片保存。其中男65例, 女43例; 年龄36-79岁, 平均年龄55岁; 肿瘤直径 $\leq 5.0$  cm 37例, 直径 $> 5$  cm 71例; 临床病理0-I期32例, II-IV期76例; 低分化20例, 中分化72例、高分化16例; 伴淋巴结转移68例, 远处转移56例。抗人EphA3单克隆抗体购自Santa Cruz公司, CD31单克隆抗体和二抗试剂盒购自Abcam公司。

## 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测: 组织经甲醛溶液固定、石蜡包埋后进行常规切片, 切片经二甲苯和乙醇脱蜡水化处理, 之后进行抗原修复、封闭内源性过氧化物酶以及正常山羊血清封闭抗原; 按照试剂说明滴加稀释后兔抗人EphA3和CD31抗体4℃过夜; 室温复温1 h后滴加生物素标记二抗, 37℃孵育30 min, PBS冲洗后DAB显色、苏木紫衬染、封片, 显微镜下观察, 结果中出现淡黄色颗粒为阳性结果。

1.2.2 微血管密度判定: 根据文献进行MVD密度评分<sup>[10]</sup>: 0未染色, 1+ 弱阳性, 2+ 中等染色, 3+ 强染色。染色百分比分数如下: 1+ 阳性细胞 $<10\%$ , 2+ 阳性细胞 $10\%-50\%$ , 3+ 阳性细胞达 $50\%$ 以上。评分在2-6为阳性, 1分以下为阴性。

统计学处理 采用SPSS18.0统计软件进行统计学分析处理, 采用Pearson  $\chi^2$ 检验计算EphA3的表达与不同临床病理特征的关系; Spearman's相关性检测分析EphA8与MVD的关系; Kaplan-Meier法绘制生存曲线, Log-rank检验分析曲线有无统计学差异。可信区间为95%, 取 $P<0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

2.1 EphA3在结肠癌组织和正常结肠黏膜中的表达情况 免疫组织化学结果表明: EphA3蛋白表达于细胞质, 呈棕黄色。108例患者结肠癌组织中69例有不同程度的表达, 阳性率为63.9%(69/108), 而15例正常结肠黏膜组织中, 阳性率为13.3%(2/15)其余均为阴性, 两者比较有统计学意义(图1A, B,  $P<0.001$ )。

2.2 EphA3表达与患者临床病理特征之间关系 结肠癌组织中, EphA3蛋白表达与临床病理指标的关系(表1)。EphA3在肿瘤直径 $>5.0$  cm病例中阳性率为(51/71)71.8%, 而直径 $\leq 5.0$  cm病例中阳性率只有(18/37)48.6%, 两者比有统计学差

## ■相关报道

在胃癌中EphA3高表达与患者年龄、肿瘤大小、组织分化程度、TNM分期、肿瘤浸润程度、淋巴结转移及患者低生存率密切相关。

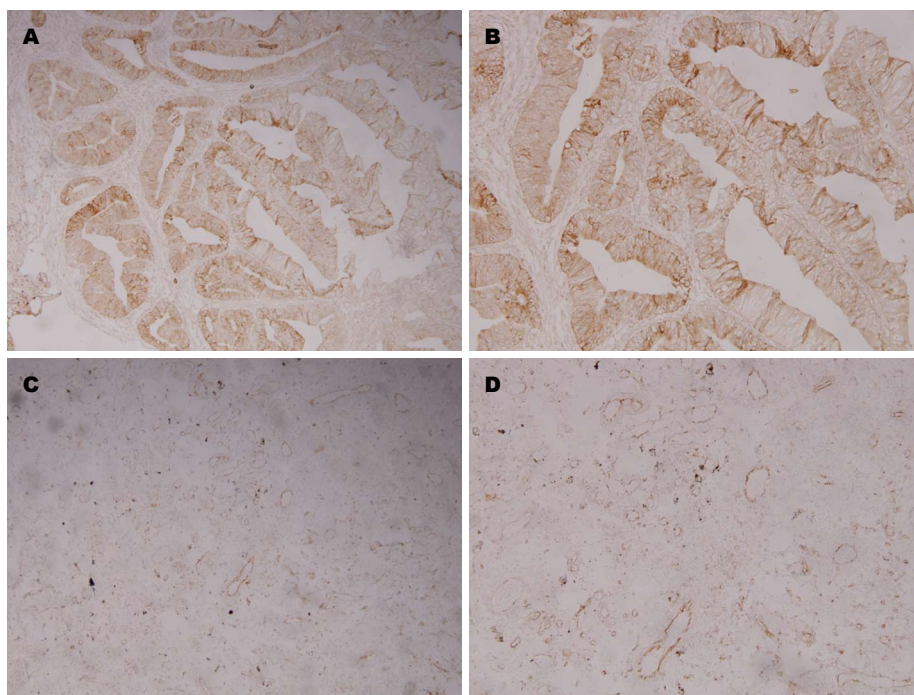


图1 免疫组织化学染色EphA3和MVD表达情况. A: EphA3( $\times 200$ ); B: EphA3( $\times 400$ ); C: MVD( $\times 200$ ); D: MVD( $\times 400$ ).

#### ■创新盘点

本文提出EphA3在结肠癌中高表达, 并且其高表达与肿瘤血管密度呈正相关, EphA3高表达与结肠癌的恶性程度相关.

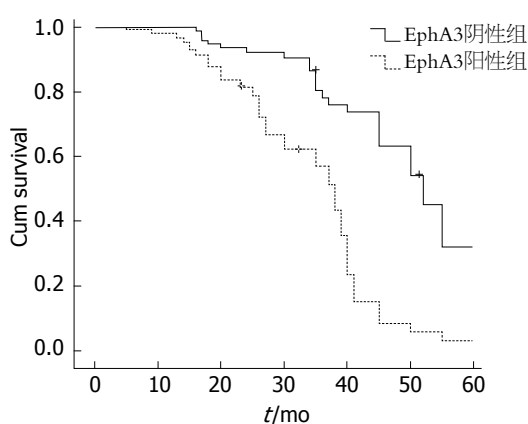


图2 结肠癌中EphA3表达和生存时间的关系(K-M线).

异( $P = 0.017$ ); EphA3表达也与肿瘤TNM分期存在相关性, 随着分期进展表达升高( $P < 0.001$ ); EphA3表达也与患者肿瘤分化程度相关, 高分化患者(6/16)阳性率为37.5%, 中等分化(45/72)阳性率为62.5%, 低分化(18/20)阳性率为90.0% ( $P = 0.007$ ); 在68例淋巴结转移患者中阳性率为(64/68)94.1%, 显著高于无淋巴结转移患者(5/40)12.5% ( $P < 0.001$ ); 有远处转移患者阳性率为(42/56)75.0%与没有远处转移者(27/52)51.9%相比有统计学差异( $P = 0.013$ ), 但EphA3表达与患者的性别和年龄差异无显著相关性.

**2.3 EphA3表达与MVD的关系** 免疫组织化学检测患者MVD, 如文献报道我们将评分值30作为分界值将患者分成两组, 其中MVD值低患者19例(17.6%), 较高患者89例(82.4%)(图1C, D).分析

发现EphA3与MVD成正相关, 其相关系数分别为0.647( $P < 0.001$ , 表2).

**2.4 生存分析** EphA3阳性患者生存时间明显短于阴性患者, 3年生存率分别为53.6%和79.5%, 患者5年生存率分别为23.1%和56.4%, 平均生存时间分别为34.3 mo  $\pm$  1.4 mo和48.4 mo  $\pm$  2.3 mo,  $\chi^2 = 24.6$ ,  $P < 0.001$ (图2).

### 3 讨论

近年来我国结肠癌发生率越来越高, 5年生存率普遍较低, 而且发病年龄也越来越年轻, 结肠癌成为威胁人类健康的一个重要疾病<sup>[9]</sup>. 结肠癌的发病较为隐匿, 大多数患者出现大便性状和次数改变时才来就诊, 此时肿瘤已经发展到中晚期, 部分已失去手术指征. 结肠癌的转移和复发是导致患者死亡的最主要原因, 虽然随着检查治疗技术的不断提高, 结肠癌的诊治效果有一定的提高, 但是尚不能完全治愈. 因此, 有必要寻找合适的检测或治疗靶点更好地为结肠癌患者服务, 达到早诊断、早治疗以及预防复发的目的.

酪氨酸激酶途径是一种非常重要的细胞内信号转导通路, 可有效地将外界刺激信息传递至细胞核. EPH基因家族是新发现最大的酪氨酸激酶受体家族成员之一, 广泛表达于上皮来源的细胞中, 这类激酶和受体相互作用可以调节神经细胞形成、血管发育和肿瘤血管的形成, 一些研究评估了这些激酶在不同人类肿瘤中的

#### ■应用要点

EphA3可能参与结肠癌血管的生成, 通过临床大量样本进一步验证, 该因子可作为临床结肠癌的诊治和预后提供参考.



## ■名词解释

微血管密度: 生物组织如皮肤、肌肉、器官等组织中单位面积密度的微血管数量, 本文中具体指在结肠癌组织中新生血管密度情况。

表 1 EphA3 表达与结肠癌临床病理特征的关系  $n(\%)$ 

	EphA3		$P$ 值
	阳性	阴性	
性别			
男	43(66.1)	22(33.9)	0.547
女	26(60.5)	17(39.5)	
年龄(岁)			
≤ 55	28(59.6)	19(40.4)	0.413
>55	41(67.2)	20(32.8)	
肿瘤大小(cm)			
>5.0	51(71.8)	20(28.2)	0.017
≤5.0	18(48.6)	19(51.4)	
肿瘤分期			
I	8(25.0)	24(75.0)	<0.001
II	19(67.9)	9(32.1)	
III	32(86.5)	5(13.5)	
IV	10(90.9)	1(9.1)	
肿瘤分化			
低分化	18(90.0)	2(10.0)	0.007
中分化	45(62.5)	27(37.5)	
高分化	6(37.5)	10(62.5)	
淋巴结转移			
有	64(94.1)	4(5.9)	<0.001
无	5(12.5)	35(87.5)	
远处转移			
有	42(75.0)	14(25.0)	0.013
无	27(51.9)	25(48.1)	

作用, 主要与细胞增殖、凋亡和肿瘤生成密切相关<sup>[10]</sup>。在人类不同肿瘤研究中发现酪氨酸激酶和其受体与肿瘤的黏附、迁移和血管生成相关; 目前实验已经证实酪氨酸激酶受体EphA1、2、4和7在结肠癌组织中高表达并参与了结肠癌发生和转移过程<sup>[3-6]</sup>。EphA3是EPH基因家族成员之一, 研究表明该基因在T和B淋巴瘤细胞中高表达, 而且与肿瘤的转移密切相关<sup>[11]</sup>。进一步研究发现EphA3在肝癌、肾癌、黑色素瘤和肉瘤组织中高表达<sup>[7,12]</sup>, 在胃癌中EphA3高表达与患者年龄、肿瘤大小、组织分化程度、TNM分期、肿瘤浸润程度、淋巴结转移以及患者低生存率密切相关。然而EphA3在结肠癌中研究有限, 而且研究结果之间互相矛盾<sup>[8,9]</sup>, 因此我们在结肠癌组织中检测了EphA3表达情况。

本研究利用免疫组织化学技术检测了EphA3蛋白在结肠癌组织及其正常黏膜中的表达情况, 结果发现: EphA3蛋白在结肠癌黏膜组织中表达明显高于其正常结肠黏膜组织, 提示EphA3可能成为结肠癌的一个新的肿瘤标志物。

表 2 EphA3表达与MVD关系 ( $n$ )

变量	EphA3		$P$ 值	$t$ 值
	阳性	阴性		
MVD				
高值	62	27	<0.001	0.647
低值	7	12		

在正常上皮细胞中EphA3能与其配体有效结合并经吞噬溶酶体途径被快速降解, 故其蛋白低表达或缺失。而在肿瘤细胞中, 因细胞间连接的破坏导致EphA3的配体结合及降解发生障碍, 而表现为高表达及异常的细胞定位<sup>[2,13]</sup>。EphA3的过度表达同时会引起EphA3功能发生变化, 成为功能强大的癌蛋白, 启动其他的信号转导途径, 调节细胞黏附、肿瘤侵袭与转移。大多数肿瘤的远处转移及复发者EphA3表达较高。本研究发现EphA3高表达与癌组织大小、TMN分期、分化程度、淋巴结转移以及远处转移有关, 表明EphA3蛋白的高表达与结肠癌黏膜上皮细胞的癌变和癌细胞的恶性侵袭能力有关。EphA3表达增高, 削弱肿瘤细胞之间的连接, 增加肿瘤细胞与细胞外基质成分的黏附, 增强对基质的侵袭, 而这些是肿瘤细胞获得侵袭、转移能力的重要特性, 提示EphA3的高表达促进了肿瘤的侵袭和转移。因此, 我们假设EphA3在结肠癌中高表达可能和DNA的甲基化有关, 而这一变化可能引起肿瘤细胞形态学和生物学特性的改变, 例如细胞增殖、活性、黏附能力、迁移能力和抗凋亡能力变化。

目前在评价肿瘤血管密度方面, MVD应用非常广泛, 研究表明较高密度的MVD与肿瘤的大小、组织分化程度、浸润情况、淋巴结是否转移密切相关, 可以通过简单的免疫组织化学方法评价各种肿瘤的进展和转移情况<sup>[14-16]</sup>。本实验中较高的MVD值和肿瘤的临床病理分期和预后密切相关。进一步研究EphA3和MVD成正相关, 即EphA3阳性肿瘤细胞中血管密度更大。

总之, 我们通过免疫组织化学方法证明了EphA3在结肠癌细胞中明显表达高于正常结肠黏膜细胞。这一结果提示在早期结肠癌中EphA3低表达患者生存率较高; EphA3高表达和肿瘤的血管生成有关, 可见该因子可作为肿瘤危险预测指标。本实验可能对于研究结肠癌血管生成和预测患者生存情况提供帮助, 具有良好的应用前景。

## 4 参考文献

- 1 Xi HQ, Wu XS, Wei B, Chen L. Eph receptors and ephrins as targets for cancer therapy. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 2894-2909 [PMID: 22862837 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2012.01612.x]
- 2 Hérault M, Schaffner F, Augustin HG. Eph receptor and ephrin ligand-mediated interactions during angiogenesis and tumor progression. *Exp Cell Res* 2006; 312: 642-650 [PMID: 16330025]
- 3 Tanabe H, Kuribayashi K, Tsuji N, Tanaka M, Kobayashi D, Watanabe N. Sesamin induces autophagy in colon cancer cells by reducing tyrosine phosphorylation of EphA1 and EphB2. *Int J Oncol* 2011; 39: 33-40 [PMID: 21503576 DOI: 10.3892/ijo.2011.1011]
- 4 Saito T, Masuda N, Miyazaki T, Kanoh K, Suzuki H, Shimura T, Asao T, Kuwano H. Expression of EphA2 and E-cadherin in colorectal cancer: correlation with cancer metastasis. *Oncol Rep* 2004; 11: 605-611 [PMID: 14767510]
- 5 Oshima T, Akaike M, Yoshihara K, Shiozawa M, Yamamoto N, Sato T, Akihito N, Nagano Y, Fujii S, Kunisaki C, Wada N, Rino Y, Tanaka K, Masuda M, Imada T. Overexpression of EphA4 gene and reduced expression of EphB2 gene correlates with liver metastasis in colorectal cancer. *Int J Oncol* 2008; 33: 573-577 [PMID: 18695888 DOI: 10.3892/ijo.00000042]
- 6 Wang J, Kataoka H, Suzuki M, Sato N, Nakamura R, Tao H, Maruyama K, Isogaki J, Kanaoka S, Ihara M, Tanaka M, Kanamori M, Nakamura T, Shinmura K, Sugimura H. Downregulation of EphA7 by hypermethylation in colorectal cancer. *Oncogene* 2005; 24: 5637-5647 [PMID: 16007213 DOI: 10.1038/sj.onc]
- 7 Wimmer-Kleikamp SH, Lackmann M. Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis. *IUBMB Life* 2005; 57: 421-431 [PMID: 16012051 DOI: 10.1080/152165]
- 8 Herath NI, Spanevello MD, Doecke JD, Smith FM, Pouponnot C, Boyd AW. Complex expression patterns of Eph receptor tyrosine kinases and their ephrin ligands in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer* 2012; 48: 753-762 [PMID: 21852108 DOI: 10.1016/j.ejca.2011.07.003]
- 9 Xi HQ, Zhao P. Clinicopathological significance and prognostic value of EphA3 and CD133 expression in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 2011; 64: 498-503 [PMID: 21415057 DOI: 10.1136/jcp.2010.087213]
- 10 Matsubara J, Yamada Y, Nakajima TE, Kato K, Hamaguchi T, Shirao K, Shimada Y, Shimoda T. Clinical significance of insulin-like growth factor type 1 receptor and epidermal growth factor receptor in patients with advanced gastric cancer. *Oncology* 2008; 74: 76-83 [PMID: 18544998 DOI: 10.1159/000139127]
- 11 Hafner C, Schmitz G, Meyer S, Bataille F, Hau P, Langmann T, Dietmaier W, Landthaler M, Vogt T. Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem* 2004; 50: 490-499 [PMID: 14726470 DOI: 10.1373/clinchem.2003.026849]
- 12 Bae HJ, Song JH, Noh JH, Kim JK, Jung KH, Eun JW, Xie HJ, Ryu JC, Ahn YM, Kim SY, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS, Nam SW. Low frequency mutation of the Ephrin receptor A3 gene in hepatocellular carcinoma. *Neoplasma* 2009; 56: 331-334 [PMID: 19469653 DOI: 10.4149/neo]
- 13 Surawska H, Ma PC, Salgia R. The role of ephrins and Eph receptors in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15: 419-433 [PMID: 15561600]
- 14 Iordache S, Saftoiu A, Georgescu CV, Ramboiu S, Gheonea DI, Filip M, Schenker M, Ciurea T. Vascular endothelial growth factor expression and microvessel density—two useful tools for the assessment of prognosis and survival in gastric cancer patients. *J Gastrointest Liver Dis* 2010; 19: 135-139 [PMID: 20593045]
- 15 Zhang Z, Wang Q, Ma J, Yi X, Zhu Y, Xi X, Feng Y, Jin Z. Reactive oxygen species regulate FSH-induced expression of vascular endothelial growth factor via Nrf2 and HIF1 $\alpha$  signaling in human epithelial ovarian cancer. *Oncol Rep* 2013; 29: 1429-1434 [PMID: 23404377 DOI: 10.3892/or.2013.2278]
- 16 Zhang N, Wu P, Wu L, Shayiremu D, Shan H, Ye L, Jiang WG, Gong K, Yang Y. The Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Inhibitor Isoforms, VEGI251, VEGI174 and VEGI192 in Human Clear-cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics* 2013; 10: 47-53 [PMID: 23382586]

## ■同行评价

本文设计合理, 方法科学, 手段较先进, 数据可靠, 分析可信, 有一定临床指导意义。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



# 地衣芽孢杆菌联合PPI三联疗法根除幽门螺杆菌的临床疗效

蒋永爱, 欧希龙, 王建宁

## ■背景资料

随着抗生素在临床治疗过程中的广泛应用, 幽门螺杆菌(*H. pylori*)对抗生素耐药率正在逐年上升, 导致*H. pylori*根除率越来越低。如何提高*H. pylori*根除率, 选择更有效的治疗方案是当前临床医生普遍关注的问题。

蒋永爱, 欧希龙, 东南大学医学院 江苏省南京市 210015  
王建宁, 南京市江宁医院消化科 江苏省南京市 211100  
蒋永爱, 副主任医师, 就读于东南大学医学院, 目前在南京江宁医院消化科从事消化内科工作。

作者贡献分布: 欧希龙指导课题设计、临床实验、论文撰写及推荐论文发表; 蒋永爱负责搜集文献资料、具体实施临床实验及撰写论文; 王建宁指导临床实验与论文撰写。

通讯作者: 欧希龙, 主任医师, 210015, 江苏省南京市丁家桥87号, 东南大学医学院。ouxilong@126.com

收稿日期: 2013-01-02 修回日期: 2013-03-01

接受日期: 2013-03-08 在线出版日期: 2013-03-28

## Efficacy of *Bacillus licheniformis* combined with PPI triple therapy in eradication of *Helicobacter pylori*

Yong-Ai Jiang, Xi-Long Ou, Jian-Ning Wang

Yong-Ai Jiang, Xi-Long Ou, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210015, Jiangsu Province, China  
Jian-Ning Wang, Department of Digestive Medicine, Jiangning Hospital, Nanjing 211100, Jiangsu Province, China  
Correspondence to: Xi-Long Ou, Chief Physician, School of Medicine, Southeast University, 87 Dingjiaqiao, Nanjing 210015, Jiangsu Province, China. ouxilong@126.com

Received: 2013-01-02 Revised: 2013-03-01

Accepted: 2013-03-08 Published online: 2013-03-28

## Abstract

**AIM:** To observe the effect of *Bacillus licheniformis* in combination with PPI triple therapy on the cure rate of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and improvement of clinical symptoms.

**METHODS:** One hundred and twenty patients who were diagnosed with erosive gastritis or peptic ulcer with *H. pylori* infection by gastroscopy, rapid urease method and pathological staining at our hospital were randomly divided into three groups: triple therapy group ( $n = 40$ , treated with lansoprazole 30 mg bid + amoxicillin 1.0 bid + levofloxacin 0.5 QD), quadruple therapy group ( $n = 40$ , treated with bismuth pectin 0.2 bid + lansoprazole 30 mg bid + amoxicillin 1.0 bid + levofloxacin 0.5 QD), and combination treatment group ( $n = 40$ , treated with *Bacillus licheniformis* 0.5 bid + lansoprazole 30 mg bid + amoxicillin

1.0 bid + levofloxacin 0.5 QD). The triple therapy and quadruple therapy groups were treated for 7 d, and the treatment group continued taking *Bacillus licheniformis* capsules for an additional 14 days. Patients with gastric ulcer continued taking LAN 30 mg, once daily for 5 wk, and those with duodenal ulcer continued taking lansoprazole 30 mg, once daily for 3 wk.

**RESULTS:** *H. pylori* eradication rate was significantly higher in the *Bacillus licheniformis* group than in the triple therapy group (85% vs 70%,  $P < 0.05$ ), but showed no significant difference between the *Bacillus licheniformis* group and quadruple therapy group (85% vs 82.5%,  $P > 0.05$ ). The clinical symptoms were improved more significantly in the *Bacillus licheniformis* group than in the triple therapy group (97.5% vs 75.0%,  $P < 0.05$ ); however, there was no significant difference in the percentage of patients showing symptom improvement between the *Bacillus licheniformis* group and quadruple therapy group (97.5% vs 95.0%,  $P > 0.05$ ). The incidence of adverse reactions was significantly lower in the *Bacillus licheniformis* group than in the triple therapy group (2.5% vs 12.5%,  $P < 0.05$ ) and quadruple therapy group 2 (2.5% vs 25.0%,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** *Bacillus licheniformis* can improve the eradication rate of *H. pylori*, alleviate clinical symptoms and reduce the incidence of adverse reactions in patients undergoing triple therapy.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Erosive gastritis; Peptic ulcer; *Bacillus licheniformis*; *Helicobacter pylori*; Eradication rate; Incidence rate

Jiang YA, Ou XL, Wang JN. Efficacy of *Bacillus licheniformis* combined with PPI triple therapy in eradication of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(9): 840-844 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/840.asp>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i9.840>

## 摘要

**目的:** 观察地衣芽孢杆菌联用标准三联疗法

## ■同行评议者

陈国忠, 主任医师, 广西中医学院第一附属医院消化内科



对幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)的根治率、临床症状改善率的影响。

**方法:** 选择我院经胃镜检查, 快速尿素酶法及病理活检染色诊断确诊为糜烂性胃炎或消化性溃疡并伴有*H. pylori*感染的患者120例, 随机分成3组: 对照组1(A组, 三联组,  $n = 40$ 例)予以兰索拉唑30 mg bid+阿莫西林1.0 bid+左氧氟沙星0.5 qd; 对照组2(B组, 四联组,  $n = 40$ 例)予以果胶铋0.2 bid+三联组; 治疗组(C组, 地衣芽孢杆菌+三联,  $n = 40$ 例)予以地衣芽孢杆菌0.5 bid+三联组。对照组疗程均为7 d, 治疗组治疗7 d后, 继续服用地衣芽孢杆菌胶囊(整肠生)14 d。另外胃溃疡患者治疗1 wk后继续服用兰索拉唑30 mg, 1次/d, 5 wk; 十二指肠溃疡患者治疗1 wk后继续服用兰索拉唑30 mg, 1次/d, 3 wk。

**结果:** 地衣芽孢杆菌组对*H. pylori*根除率明显高于标准三联组(85.0% vs 70.0%,  $P < 0.05$ )、而和铋四联组比较, 无显著性差异(85.0% vs 82.5%,  $P > 0.05$ ); 地衣芽孢杆菌组对患者临床症状缓解明显高于对照组1(标准三联组)(97.5% vs 75.0%,  $P < 0.05$ )、而与对照组2(铋四联组)比较, 无明显差异(97.5% vs 95.0%,  $P > 0.05$ ); 地衣芽孢杆菌组不良反应发生率低于明显对照组1(2.5% vs 12.5%,  $P < 0.05$ )和对照组2(2.5% vs 25.0%,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 地衣芽孢杆菌能提高标准三联疗法*H. pylori*根除率, 明显缓解患者临床症状, 减少不良反应的发生率。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 糜烂性胃炎; 消化性溃疡; 地衣芽孢杆菌; 幽门螺杆菌; 根治率; 不良反应

蒋永爱, 欧希龙, 王建宁. 地衣芽孢杆菌联合PPI三联疗法根除幽门螺杆菌的临床疗效. 世界华人消化杂志 2013; 21(9): 840-844 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/840.asp>  
DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i9.840>

## 0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)发现至今已有30年, 对*H. pylori*感染的治疗也越来越深入, 它是一种存在于人类胃黏膜的G-的螺旋形细菌, 是慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌及胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤等的发生发展的重要因素<sup>[1]</sup>, 根除*H. pylori*是预防溃疡复发<sup>[2]</sup>和治疗慢性胃炎的重要手段, 而对于慢性胃炎患者, 根除*H.*

*pylori*治疗还可降低其胃癌的发生率<sup>[3]</sup>, 目前*H. pylori*根除治疗方案很多, 其中PPI加两种抗生素的三联疗法, 仍是当前国内外根治*H. pylori*共识意见推荐的一线治疗方法。但是, 随着抗生素在临床治疗过程中的广泛应用, *H. pylori*对抗生素耐药率正在逐年上升<sup>[4]</sup>, 导致*H. pylori*根除率越来越低<sup>[5,6]</sup>。如何提高*H. pylori*根除率, 选择更有效的治疗方案是当前临床医生普遍关注的问题。近年来, 微生态制剂, 益生菌在根除*H. pylori*感染过程中的作用越来越受到人们的重视。国外研究表明<sup>[7]</sup>, 微生态制剂不仅能改善胃肠道生态平衡, 减少不良反应, 提高患者依从性, 而且能提高*H. pylori*根除率。本实验选用的为益生菌-地衣芽孢杆菌(整肠生), 临床较少运用于清除*H. pylori*。我们通过地衣芽孢杆菌联合质子泵抑制剂(proton pump inhibitors, PPI)为基础的三联疗法进行*H. pylori*根除治疗, 与单用PPI三联及含铋四联治疗相比较, 观察其是否能提高*H. pylori*根除率、临床症状缓解率以及减少不良反应的发生率。最终取得满意效果, 现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验通过收集我院胃镜室2012-05/2013-01经胃镜检查确诊为慢性活动性胃炎或消化性溃疡, 并行快速尿素酶法及病理活检Giemsa染色法同时证实*H. pylori*感染的患者120例。入选标准: (1)经胃镜检查确诊的糜烂性胃炎及十二指肠溃疡患者; (2)快速尿素酶试验和胃镜检查病理活检Giemsa染色法同时证实*H. pylori*阳性者; (3)既往未接受过正规*H. pylori*根除治疗。排除标准: (1)年龄<17岁或>80岁; (2)治疗前2 wk用过抗生素、铋剂、H2受体阻滞剂(H2 receptor antagonist, H2RA)、PPI和长期使用甾体或非甾体类抗炎药(nonsteroidal antiinflammatory drug, NSAID)者; (3)既往胃部手术史、妊娠或哺乳期妇女; (4)对本研究用药物过敏者; (5)同时存在其他影响本研究评价的严重疾病或者不能正确表达自己主诉, 如有药物成瘾、精神障碍等依从性差者, 不能合作者。终止研究标准: (1)病情恶化或出现严重并发症; (2)治疗期间出现严重不良反应, 无法耐受者; (3)治疗期间出现其他疾病干扰本观察; (4)失访; (5)治疗期间妊娠。治疗药物: 兰索拉唑(湖北潜龙药业有限公司)、阿莫西林(上海衡山药业有限公司)、左氧氟沙星(四川科伦药业有限公司)、果胶铋(哈药集团)、地衣芽孢杆菌(辽宁胜方医药有限公司)。

## 1.2 方法

### ■ 研发前沿

目前益生菌在*H. pylori*治疗方面的研究很多, 科研设计方案也是多种多样, 存在很多问题, 如益生菌与抗生素联合使用的间隔时间、服药方法等。

## ■ 创新盘点

目前根除 *H. pylori* 的两联抗生素多为克拉霉素和阿莫西林, 阿莫西林联合左氧氟沙星根除 *H. pylori* 较少报道; 益生菌研究方面, 大多为双歧杆菌, 较少研究地衣芽孢杆菌, 本实验使用地衣芽孢杆菌联合兰索拉唑、阿莫西林、左氧氟沙星进行 *H. pylori* 根除, 目前鲜有报道。

表 1 3组患者 *H. pylori* 根除率 ( $n = 40$ )

分组	阳性( $n$ )	阴性( $n$ )	根除率(%)
三联组	12	28	70.0
铋四联组	7	33	82.5
地衣芽孢杆菌组	6	34	85.0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 标准三联组。

1.2.1 分组: 对符合条件的120例患者根据就诊先后随机分为标准三联组(A组, 兰索拉唑+阿莫西林+左氧氟沙星)、四联对照组(B组, 果胶铋+三联)和地衣芽孢杆菌治疗组(C组, 地衣芽孢杆菌+三联标准)。A组40例, 男28例, 女12例, 平均年龄为44.4岁; B组40例, 男34例, 女6例, 平均年龄42.8岁; C组40例, 男27例, 女13例, 平均年龄45.1岁, 3组患者一般资料比较差异无统计学意义。

1.2.2 治疗: 三联组(A组): 兰索拉唑30 mg bid+阿莫西林1.0 bid+左氧氟沙星0.5 qd疗程7 d; 铋四联组(B组): 兰索拉唑30 mg bid+阿莫西林1.0 bid+左氧氟沙星0.5 qd+果胶铋0.2 bid疗程7 d; 地衣芽孢杆菌+三联组(C组): 兰索拉唑30 mg bid+阿莫西林1.0 bid+左氧氟沙星0.5 qd, (10:00-16:00) 疗程7 d; 地衣芽孢杆菌胶囊(整肠生), 2粒 tid, 21 d(服用时与抗菌药物服用至少间隔2 h, 7:00-12:00-20:00)。胃溃疡患者治疗1 wk后继续服用兰索拉唑30 mg 1次/d, 5 wk, 十二指肠溃疡患者治疗1 wk后继续服用兰索拉唑30 mg, 1次/d, 3 wk。停药4 wk后(治疗结束后4 wk), 行<sup>13</sup>C尿素呼气试验了解 *H. pylori* 根除情况。

1.2.3 观察指标及疗效判定标准: (1)临床症状及不良反应观察: 记录治疗前消化道症状(上腹痛、腹胀、反酸、嗝气、纳差等症状), 服药后第1周不良反应事件(头痛、恶心呕吐、腹泻、皮疹等症状)的发生率, 第1、3周症状缓解率和疗程结束后4 wk的 *H. pylori* 根除率; (2)临床症状缓解分级: 0 无症状; I 轻度, 可以感觉到有症状但易于耐受; II 中度, 明显不适, 足以干扰正常活动; III 重度, 不能从事正常活动。治疗后症状改善 I 级判定为治疗显效; 治疗后症状改善 II 级以上(含 II 级)都判定为症状缓解; (3) *H. pylori* 根除标准: 疗程结束后, 停药4 wk, 复查<sup>13</sup>C-尿素呼气试验, 阴性认为 *H. pylori* 被根除。<sup>13</sup>C-尿素呼气试验采用安徽养和医疗器械设备有限公司生产的YH04幽门螺杆菌检测仪及<sup>13</sup>C-尿素胶囊。

**统计学方法** 所有数据采用SPSS10.0软件进行统计分析, 计数资料采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 表示

有统计学意义。

## 2 结果

120例患者均坚持满疗程治疗(溃疡患者包括抗溃疡治疗), 疗程结束后无1例失访。

2.1 *H. pylori* 根除率 标准三联组( $n = 40$ )疗程结束后, *H. pylori* 根除28例, 根除率70.0%, 铋四联组( $n = 40$ )疗程结束后, *H. pylori* 根除33例, 根除率82.5%, 地衣芽孢杆菌组疗程结束后, *H. pylori* 根除34例, 根除率85.0%; 地衣芽孢杆菌组对 *H. pylori* 根除率明显高于标准三联组(85.0% vs 70.0%,  $P < 0.05$ )、而和铋四联组对 *H. pylori* 根除率比较, 无显著性差异(85.0% vs 82.5%,  $P > 0.05$ , 表1)。

2.2 临床症状改善率 治疗7 d后临床症状改善率: 标准三联组, 临床症状改善30例, 改善率75.0%; 铋四联组, 临床症状改善38例, 改善率95.0%; 地衣芽孢杆菌组, 临床症状改善38例, 改善率97.5%; 地衣芽孢杆菌组对患者临床症状改善明显高于标准三联组(97.5% vs 75.0%,  $P < 0.05$ )、而与铋四联组比较, 无明显差异(97.5% vs 95.0%,  $P > 0.05$ , 表2)。治疗21 d后3组患者临床症状基本消失, 无统计学差异。

2.3 不良反应发生率 标准三联组治疗7 d后, 发生头痛、恶心呕吐等不良反应6例, 发生率12.5%; 铋四联组, 治疗7 d后, 发生头痛、恶心呕吐等不良反应10例, 发生率25.0%; 地衣芽孢杆菌组, 治疗7 d后, 发生头痛、恶心呕吐等不良反应1例, 发生率为2.5%; 地衣芽孢杆菌组明显低于标准三联组(2.5% vs 12.5%,  $P < 0.05$ )和铋四联组(2.5% vs 25.0%,  $P < 0.05$ , 表3)。

## 3 讨论

我国是一个 *H. pylori* 感染率较高的国家, 感染率42.0%-90.0%<sup>[8]</sup>, *H. pylori* 已被确认与慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤和胃癌密切相关<sup>[1]</sup>, 世界卫生组织已将其列为 I 类致癌因子。因此, *H. pylori* 感染的治疗是 *H. pylori* 研究领域中的重点, 中华医学会消化病学分会 *H. pylori* 学组于2005-03/2006-05完成了一项涉及全国16个省市包括20多个中心的大规模 *H. pylori* 耐药(包括对甲硝唑、克拉霉素和阿莫西林)流行病学调查及耐药对治疗的影响, 结果显示 *H. pylori* 对常用抗生素耐药性随时间变迁而逐渐上升<sup>[9]</sup>。面对 *H. pylori* 治疗上的困境, 微生态制剂(益生菌)在根除 *H. pylori* 感染过程中的作用越来越

表 2 3组患者治疗7 d后临床症状缓解率 ( $n = 40$ )

分组	显效( $n$ )	缓解( $n$ )	无效( $n$ )	有效率(%)
三联组	17	13	10	75.0
铋四联组	28	10	2	95.0
地衣芽孢杆菌组	28	24	1	97.5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 标准三联组。

越受到人们的重视。近年来随着微生态医学的兴起, 微生态制剂(益生菌)在临床的广泛应用也为 *H. pylori* 感染防治提供了新的思路。 *H. pylori* 对上皮细胞的黏附力是 *H. pylori* 能牢固定植于胃黏膜的基本条件, 也是 *H. pylori* 导致胃黏膜损伤的重要原因之一, 而益生菌能抑制 *H. pylori* 的黏附, 其确切机制并不清楚, 可能机制是<sup>[10]</sup>: 益生菌分泌的某些抗细菌黏附的活性物质; 益生菌可与 *H. pylori* 竞争黏附于胃黏膜结合位点, 即所谓的“夺位”作用。体外实验显示: 益生菌可以抑制 *H. pylori* 对肠上皮细胞 HT29 或胃内皮细胞 NKN45 的黏附<sup>[11]</sup>。在体外, 益生菌可以通过竞争黏附位点干扰 *H. pylori* 与胃上皮细胞的黏附。动物实验也证实<sup>[12]</sup>, 预先给予益生菌, 可以阻止或减少无菌鼠的 *H. pylori* 定植, 这可能与益生菌阻碍了 *H. pylori* 的黏附有关。已有研究显示<sup>[13]</sup>: 益生菌可能通过活化 *H. pylori* 感染中细胞因子信号抑制物的表达和信号转导来发挥抗炎作用, 其结果提示益生菌的抗炎作用有可能通过抑制 *H. pylori* 感染中产生的炎性介质表达来实现的。因而, 他不仅可能具有对抗 *H. pylori* 感染的作用, 而且还能调节机体的免疫机能, 通过改善胃肠道微生态环境, 提高 *H. pylori* 根除治疗的依从性等多种作用<sup>[14]</sup>。本实验通过“益生菌-地衣芽孢杆菌(整肠生)联合PPI三联疗法”, 与传统标准三联疗法及含铋四联疗法在 *H. pylori* 根除率及临床症状改善率方面进行对比研究, 结果显示: 地衣芽孢杆菌能提高标准三联疗法 *H. pylori* 根除率, 提高临床症状缓解, 减少不良反应的发生率。国外 Iakovenko 等<sup>[15]</sup> 在类似研究中发现, 接受三联抗生素加益生菌组治疗与三联抗生素相比, *H. pylori* 根除率分别为 89.1% 和 63.5%, 实验结果与我们大致相仿。Sheu 等<sup>[16]</sup> 也证实了三联疗法加益生菌组比单用三联疗法 *H. pylori* 根除率高 (91% vs 78%,  $P < 0.05$ ), 且可以明显减少三联疗法治疗过程中出现的恶心、呕吐、腹泻、头痛的发生率。

表 3 3组患者治疗7 d后不良反应发生率 ( $n = 40$ )

分组	不良反应阳性( $n$ )	不良反应发生率(%)
三联组	6	12.5
铋四联组	10	25.0
地衣芽孢杆菌组	1	2.5 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 标准三联组和铋四联组。

总之, 我们认为地衣芽孢杆菌胶囊(整肠生)联合三联疗法治疗 *H. pylori* 感染具有安全性好、疗效高、不良反应小的特点, 为益生菌联合PPI三联根除 *H. pylori* 提供了有力的循证医学证据, 在根除 *H. pylori* 过程中使用益生菌值得临床推广。当然, 本研究样本量较小, 还需进行大样本研究, 以进一步佐证衣芽孢杆菌(整肠生)在清除 *H. pylori* 过程中的作用。

#### 4 参考文献

- Jin Z, Hu FL, Wei H, Tang XY, Dong Y. [Establishment of Mongolian gerbil model of long-term *Helicobacter pylori* infection]. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 1518-1522 [PMID: 18956630]
- Miwa H, Sakaki N, Sugano K, Sekine H, Higuchi K, Uemura N, Kato M, Murakami K, Kato C, Shiotani A, Ohkusa T, Takagi A, Aoyama N, Haruma K, Okazaki K, Kusugami K, Suzuki M, Joh T, Azuma T, Yanaka A, Suzuki H, Hashimoto H, Kawai T, Sugiyama T. Recurrent peptic ulcers in patients following successful *Helicobacter pylori* eradication: a multicenter study of 4940 patients. *Helicobacter* 2004; 9: 9-16 [PMID: 15156899 DOI: 10.1111/j.1083-4389.2004.00194.x]
- Wong BC, Lam SK, Wong WM, Chen JS, Zheng TT, Feng RE, Lai KC, Hu WH, Yuen ST, Leung SY, Fong DY, Ho J, Ching CK, Chen JS. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 187-194 [PMID: 14722144 DOI: 10.1001/jama.291.2.187]
- Ott EA, Mazzoleni LE, Edelweiss MI, Sander GB, Wortmann AC, Theil AL, Sommi G, Cartell A, Rivero LF, Uchôa DM, Francesconi CF, Prolla JC. *Helicobacter pylori* eradication does not cause reflux oesophagitis in functional dyspeptic patients: a randomized, investigator-blinded, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 1231-1239 [PMID: 15882244 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2005.02461.x]
- Gao W, Cheng H, Hu F, Li J, Wang L, Yang G, Xu L, Zheng X. The evolution of *Helicobacter pylori* antibiotics resistance over 10 years in Beijing, China. *Helicobacter* 2010; 15: 460-466 [PMID: 21083752 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2010.00788.x]
- 成虹, 胡伏莲, 李江. 幽门螺杆菌耐药性对其根除治疗影响的研究. *中华医学杂志* 2006; 86: 2679-2682
- Rokka S, Myllykangas S, Joutsjoki V. Effect of specific colostral antibodies and selected lactobacilli on the adhesion of *Helicobacter pylori* on AGS

#### ■应用要点

本研究通过地衣芽孢杆菌联合质子泵抑制剂(PPI)为基础的三联疗法进行 *H. pylori* 根除治疗, 与单用PPI三联及含铋四联治疗相比较, 最终结果: 地衣芽孢杆菌能提高标准三联疗法 *H. pylori* 根除率, 明显缓解患者临床症状, 降低不良反应的发生率。



## ■同行评价

本研究有一定的科学意义,设计基本合理.

- 8 Pellicano R, Astegiano M, Smedile A, Bonardi R, Morgando A, Repici A, Rizzetto M. [Non-invasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in the 2006 clinical practice]. *Minerva Med* 2006; 97: 19-24 [PMID: 16565694]
- 9 Marzio L, Coraggio D, Capodicasa S, Grossi L, Cappello G. Role of the preliminary susceptibility testing for initial and after failed therapy of *Helicobacter pylori* infection with levofloxacin, amoxicillin, and esomeprazole. *Helicobacter* 2006; 11: 237-242 [PMID: 16882326 DOI: 10.1111/j.1523-5378.2006.00407.x]
- 10 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 第3版. 北京: 中国科技出版社, 2009: 635-644
- 11 Nam H, Ha M, Bae O, Lee Y. Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 4642-4645 [PMID: 12200324 DOI: 10.1128/AEM.68.9.4642-4645.2002]
- 12 Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* 1997; 41: 49-55 [PMID: 9274471 DOI: 10.1136/gut.41.1.49]
- 13 Lee JS, Paek NS, Kwon OS, Hahm KB. Anti-inflammatory actions of probiotics through activating suppressor of cytokine signaling (SOCS) expression and signaling in *Helicobacter pylori* infection: a novel mechanism. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 194-202 [PMID: 20136974 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.06127.x]
- 14 Ables AZ, Simon I, Melton ER. Update on *Helicobacter pylori* treatment. *Am Fam Physician* 2007; 75: 351-358 [PMID: 17304866]
- 15 Iakovenko EP, Grigor'ev IA, Iakovenko AV, Agafonova NA, Prishchikova AS, Sheregova EN, Vasil'ev IV, Komleva IuV, Oprishchenko IV, Anashkin VA. [Effects of probiotic bifiform on efficacy of *Helicobacter pylori* infection treatment]. *Ter Arkh* 2006; 78: 21-26 [PMID: 16613091]
- 16 Sheu BS, Wu JJ, Lo CY, Wu HW, Chen JH, Lin YS, Lin MD. Impact of supplement with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*-containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1669-1675 [PMID: 12197847 DOI: 10.1046/j.1365-2036.2002.01335.x]

编辑 李军亮 电编 鲁亚静



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

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology], 是一本由来自国内30个省、市、自治区、特别行政区的483位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医中药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。

# 《世界华人消化杂志》投稿须知

## 1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology*, *WCJD*, ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569) 是一份同行评议和开放获取期刊(*Open Access Journal*, *OAJ*), 创始于1993-01-15, 旬刊, 每月8、18和28号出版。《世界华人消化杂志》编辑委员会成员, 由483位专家组成, 分布在30个省市、自治区和特别行政区。

《世界华人消化杂志》的首要任务是出版胃肠病学, 肝病, 消化系内镜学, 消化系外科学, 消化系肿瘤学, 消化系影像学, 消化系介入治疗, 消化系病理学, 消化系感染学, 消化系药理学, 消化系病理生理学, 消化系病理学, 消化系循证医学, 消化系管理学, 胰腺病学, 消化系检验医学, 消化系分子生物学, 消化系免疫学, 消化系微生物学, 消化系遗传学, 消化系转化医学, 消化系诊断学, 消化系治疗学和糖尿病等领域的原始创新性文章, 综述文章和评论性的文章。最终目的是出版高质量的文章, 提高期刊的学术质量, 使之成为指导本领域胃肠病学和肝病学实践的重要学术性期刊, 提高消化系疾病的诊断和治疗水平。

《世界华人消化杂志》由百世登出版集团有限公司(*Baishideng Publishing Group*, *BPG*)主办和出版的一份印刷版, 电子版和网络版三种版本的学术类核心期刊, 由北京百世登生物医学科技有限公司生产制作, 所刊载的全部文章存储在《世界华人消化杂志》网站上。OAJ最大的优点是出版快捷, 一次性缴纳出版费, 不受版面和彩色图片限制, 作者文章在更大的空间内得到传播, 全球读者免费获取全文PDF版本, 网络版本和电子期刊。论文出版后, 作者可获得高质量PDF, 包括封面、编委会成员名单、目次、正文和封底, 作为稿酬, 样刊两本。BPG拥有专业的编辑团队, 涵盖科学编辑、语言编辑和电子编辑。目前编辑和出版42种临床医学OAJ期刊, 其中英文版41种, 具备国际一流的编辑与出版水平。

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

Journals》和《Digital Object Identifier》收录。《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号。《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学研究领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 循证医学, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

## 2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(*International Committee of Medical Journal Editors*)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(*Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals*)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》收录的学术期刊。

《世界华人消化杂志》英文摘要被《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

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

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

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位。原来的“分子

量”应改为物质的相对分子质量。如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体)。计量单位在+、-及后列出。在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d, 3.56 ± 0.27 pg/mL应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L。BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$ , WBC数用 $1 \times 10^9/L$ , WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L。明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示。1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸。长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm。生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L。年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁。例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm。国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d。在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一。单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs。半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示。

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英文大写F; (3)卡方检验用希文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的



相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希文小写 $\nu$ ; (6)样本数用英文小写 $n$ ; (7)概率用英文斜体大写 $P$ . 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 平均数±标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$ . 统计学显著性用 $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP < 0.05$ ,  $^dP < 0.01$ ; 第三套为 $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$ 等.

**2.6 数字用法** 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L  $\pm$  0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如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 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g  $\pm$  420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg  $\pm$  0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm  $\pm$  0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48  $\rightarrow$  23.5  $\rightarrow$  24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq 100$ , 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. 完整的阿拉伯数字不移行!

**2.7 标点符号** 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用

于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

**3.1 题名** 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

**3.2 作者** 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

**3.3 单位** 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

**3.4 第一作者简介** 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

**3.5 作者贡献分布** 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

**3.6 同行评议者** 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893, Email: wjcd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行,每月8、18、28日出版。

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

### 3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wejd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征。如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准。如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参

考文献。序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选。表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述。如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ 。 $P$ 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 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上

角注码号. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>. 无法在线提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投

稿须知下载网址:<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>. 审稿过程平均时间需要14-28天. 所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审.

## 6 修回稿须知

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

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把退修稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任.

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有.

### 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-5908-0035  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进.



## 2013年国内国际会议预告

2013-01-24/26

美国临床肿瘤学会胃肠肿瘤(ASCO GI)研讨会

会议地点: 美国旧金山

联系方式: [www.gicasym.org](http://www.gicasym.org)

2013-02-10/15

2013年肠道微生物组: 免疫网络效应/法规Keystone Symposia 会议

会议地点: 美国

联系方式: [info@keystonesymposia.org](mailto:info@keystonesymposia.org)

2013-02-09/12

美国肠外与肠道营养学会(A.S.P.E.N.): 2013临床营养周(CNW 2013)

会议地点: 美国亚利桑那州凤凰城

联系方式: <http://www.nutritioncare.org/ClinicalNutritionWeek/index.aspx?id=508>

2013-02-22/23

国立压力性溃疡顾问委员会(NPUAP)全国双年会

会议地点: 美国休斯顿

联系方式: [http://www.npuap.org/NPUAPnews-Spring11\[1\]](http://www.npuap.org/NPUAPnews-Spring11[1])

2013-02-22/23

迈阿密大学肝胆疾病临床实践会议

会议地点: 美国

联系方式: [cme.med.miami.edu/x88.xml](http://cme.med.miami.edu/x88.xml)

2013-03-01/31

2013年北京第七届疝和腹壁外科国际学术研讨会

会议地点: 北京市

联系方式: [zhshfbwkzz@yahoo.com.cn](mailto:zhshfbwkzz@yahoo.com.cn)

2013-03-01/04

2013加拿大消化疾病周(CDDW)

会议地点: 加拿大

联系方式: [www.cag-acg.org/cddw](http://www.cag-acg.org/cddw)

2013-03-07/10

亚太肝脏研究协会(APASL)第23届会议

会议地点: 新加坡

联系方式: [www.apaslconference.org](http://www.apaslconference.org)

2013-03-15/17

2013年腹腔镜胃肠外科高峰论坛

会议地点: 深圳市

联系方式: [ewancool@hotmail.com](mailto:ewancool@hotmail.com)

2013-03-14/16

中部外科学会(CSA)2013年会

会议地点: 美国佛罗里达州阿米莉亚岛

联系方式: <http://www.centraalsurg.org/meeting/futuremtgs.html>

2013-04-12/14

2013中国肛肠创新论坛(CICS)

会议地点: 北京市

联系方式: [www.crdinnovation.com](http://www.crdinnovation.com)

2013-04-19/23

2013第2届国际肿瘤学论坛

会议地点: 瑞士

联系方式: [cihexpo@163.com](mailto:cihexpo@163.com)

2013-05-23/25

2013第六届世界癌症大会

会议地点: 西安市

联系方式: [bithuiyi@163.com](mailto:bithuiyi@163.com)

2013-05-20/22

2013年第三届内分泌与代谢大会

会议地点: 西安市

联系方式: [nancy@bitconferences.cn](mailto:nancy@bitconferences.cn)

2013-05-31/06-04

2013美国临床肿瘤协会年会

会议地点: 美国芝加哥

联系方式: [yangxinxue999@163.com](mailto:yangxinxue999@163.com)

2013-06-07/09

中国国际肿瘤营养与支持治疗研讨会暨第一届全国肿瘤营养与支持治疗学术会议

会议地点: 武汉市

联系方式: [csonsc@VIP.163.com](mailto:csonsc@VIP.163.com)

2013-06-21/23

中国消化科学论坛

会议地点: 张家界市

联系方式: [casgmail@126.com](mailto:casgmail@126.com)

2013-07-13/14

中华医学会2013年肝病与代谢学术研讨会

会议地点: 银川市

联系方式: [lilyjia@163.com](mailto:lilyjia@163.com)

2014-09-26/30

第39届欧洲临床肿瘤学会年会

会议地点: 西班牙

联系方式: <http://www.esmo.org/events/madrid-2014-esmo-congress.html>

2013-10-18/20

第二十二届亚太抗癌大会

会议地点: 天津市

联系方式: [secretariat@apcc2013.com](mailto:secretariat@apcc2013.com)

## 志谢世界华人消化杂志编委

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

陈敬贤 教授  
安徽医科大学微生物学教研室

程树群 副教授  
中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗三科

崔云甫 教授  
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

高英堂 研究员  
天津市第三中心医院

顾国利 副主任医师  
中国人民解放军空军总医院普通外科

顾岩 教授  
上海交通大学医学院附属上海第九人民医院普外科

郭永红 副主任医师  
西安交通大学医学院第二附属医院感染科

郝立强 副教授  
上海长海医院普外二科

何松 教授  
重庆医科大学附属第二医院消化内科

江学良 教授  
中国人民解放军济南军区总医院消化科

姜波健 教授  
上海交通大学医学院附属第三人民医院普通外科

李涛 副主任医师  
北京大学人民医院肝胆外科

李永翔 教授  
安徽医科大学第一附属医院普外科

李勇 副教授  
上海中医药大学附属市中医医院消化科

李瑜元 教授  
广州市第一人民医院内科

李正荣 副教授  
南昌大学附属第一医院胃肠外科(普六病区)

刘宝林 教授  
中国医科大学附属盛京医院

刘炳亚 研究员  
上海交通大学医学院附属瑞金医院上海消化外科研究所

刘丽江 教授  
江汉大学医学院病理学

刘亮明 副教授  
上海交通大学附属第一人民医院松江分院肝病科

刘颖斌 主任医师  
上海交通大学医学院附属新华医院

刘占举 教授  
同济大学附属上海市第十人民医院

禄韶 副教授  
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

彭宗根 副研究员  
中国医学科学院医药生物技术研究病毒室

王刚 副研究员  
哈尔滨医科大学附属第一医院胰胆外科(普外二科)

许剑民 教授  
上海市复旦大学附属中山医院普外科

杨江华 副教授  
皖南医学院弋矶山医院感染科

张国 主任医师  
广西壮族自治区人民医院科研部

张明辉 副主任医师  
河北医科大学第一医院肝病中心(传染病)

赵青川 教授  
西京医院消化外科

## 《中文核心期刊要目总览》收录证书

### 《中文核心期刊要目总览》入编通知

尊敬的主编先生/女士：

我们谨此郑重通知：依据文献计量学的原理和方法，经研究人员对相关文献的检索、统计和分析，以及学科专家评审，贵刊《世界华人消化杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2011年版（即第六版）之临床医学/特种医学类的核心期刊。该书由北京大学出版社出版。书中按《中国图书馆分类法》的学科体系，列出了73个学科的核心期刊表，并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括：题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN号、CN号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。

评选核心期刊的工作，是运用科学方法对各种刊物在一定时期内所刊载论文的学术水平和学术影响力进行综合评价的一种科研活动，研究工作量浩大。北京地区十几所高校图书馆、中国科学院国家科学图书馆、中国社会科学院文献信息中心、中国人民大学书报资料中心、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社、中国科学技术信息研究所、北京万方数据股份有限公司、国家图书馆等相关单位的百余名专家和期刊工作者参加了研究。

课题组对核心期刊的评价理论、评价方法等问题进行了深入研究，进一步改进了核心期刊评价方法，使之更趋科学合理，力求使评价结果符合客观实际。对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标，选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种，统计到的文献数量共计221177余万篇次，涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审，从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

需要特别指出的是，该研究成果只是一种参考工具书，主要是为图书情报界、出版界等需要对期刊进行评价的用户提供参考，例如为各图书情报部门的中文期刊采购和读者导读服务提供参考帮助等，不应作为评价标准。谨此说明。

顺颂  
撰安

《中文核心期刊要目总览》2011年版编委会  
代章：—

2012年1月

图书馆





百世登  
**Baishideng**®

Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**

Flat C, 23/F., Lucky Plaza,

315-321 Lockhart Road, Wan Chai, Hong Kong, China

Fax: +852-3177-9906

Telephone: +852-6555-7188

E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

