

干细胞技术治疗糖尿病的研究进展与应用前景

魏蕊, 洪天配

魏蕊, 洪天配, 北京大学第三医院内分泌科 北京市 100191
洪天配, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事糖尿病、干细胞分化方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30771032; 81070701
高等学校博士学科点专项科研基金资助项目, No. 20100001110083

作者贡献分布: 本文设计和指导由洪天配完成; 写作由魏蕊完成。
通讯作者: 洪天配, 教授, 主任医师, 100191, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院内分泌科。tpho66@bjmu.edu.cn
电话: 010-82265515 传真: 010-62017700
收稿日期: 2010-12-17 修回日期: 2011-01-28
接受日期: 2011-02-15 在线出版日期: 2011-02-18

Stem cell therapy for diabetes: progress and prospects

Rui Wei, Tian-Pei Hong

Rui Wei, Tian-Pei Hong, Department of Endocrinology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30771032; 81070701; and the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education, No. 20100001110083

Correspondence to: Professor Tian-Pei Hong, Department of Endocrinology, Peking University Third Hospital, 49 North Huayuan Road, Haidian District, Beijing 100191, China. tpho66@bjmu.edu.cn

Received: 2010-12-17 Revised: 2011-01-28

Accepted: 2011-02-15 Published online: 2011-02-18

Abstract

Stem cells can supply sufficient islet cells for cell replacement therapy in patients with diabetes. Many types of stem cells, including embryonic stem (ES) cells, induced pluripotent stem (iPS) cells, and somatic stem cells, have been shown to be able to differentiate into insulin-producing cells either *in vitro* or *in vivo*, which could ameliorate hyperglycemia in diabetic animal models. Furthermore, several small-scale pilot clinical studies have demonstrated the potential efficacy of autologous hematopoietic stem cell transplantation in treating diabetes. Great progress has been made in basic research on the differentiation of insulin-producing cells from human ES cells, in which the ethical debate and immunological rejection are unavoidable. Use of human iPS cells and autologous somatic stem cells can avoid such problems. However, the safety of iPS cells in future clinical application and the amplification, identification and differentiation

of somatic stem cells deserve further investigation. This paper aims to present an overview of different types of stem cells, strategies for differentiation into islet cells, and the problems and prospects of stem cell therapy for diabetes.

Key Words: Diabetes; Stem cells; Differentiation; Transplantation

Wei R, Hong TP. Stem cell therapy for diabetes: progress and prospects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 441-450

摘要

干细胞技术可以为糖尿病的细胞替代治疗提供足量胰岛细胞。胚胎干(embryonic stem, ES)细胞、诱导性多潜能干(induced pluripotent stem, iPS)细胞及成体干细胞可以在体外或体内分化为胰岛素分泌细胞,并可降低糖尿病动物模型的血糖。在小规模的临床试验中,自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病已经初步显示出一定的疗效。ES细胞定向分化为胰岛素分泌细胞的基础研究较为深入,但存在伦理学争议和免疫排斥问题。iPS细胞和自体的成体干细胞可避免上述难题,但iPS细胞临床应用的可行性和安全性有待进一步探讨,成体干细胞的扩增、鉴定及分化等方面的研究工作尚需进一步开展。本文对各种干细胞的研究概况、向胰岛细胞分化策略的研究进展、面临的问题及发展前景作一综述。

关键词: 糖尿病; 干细胞; 分化; 移植

魏蕊, 洪天配. 干细胞技术治疗糖尿病的研究进展与应用前景. *世界华人消化杂志* 2011; 19(5): 441-450

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/441.asp>

0 引言

糖尿病是一种以血糖水平升高为基本特征的慢性代谢性疾病,近年来其患病率在全球呈现快速增长的趋势。随着病情进展,患者的胰岛β细胞功能进行性丧失,导致高血糖的持续恶化。长期的高血糖状态可引发多种大血管和微血管的并发症,引起多脏器功能障碍甚至衰竭,严重影响

■背景资料

胰岛移植是治愈糖尿病的潜在希望。然而,供体胰岛来源不足和免疫排斥反应限制了胰岛移植的广泛开展。干细胞研究的兴起为解决上述难题提供了新思路。将干细胞体外扩增并诱导分化为胰岛细胞可以解决胰岛来源不足的问题,采用患者特异性的干细胞相关技术有望克服免疫排斥的难题。

■同行评议者

高国全, 教授, 中山大学中山医学院生化系

■ 研发前沿

患者自体的成体干细胞亦不存在伦理和免疫排斥问题,同时成瘤风险低的特性使其成为目前临床应用研究的焦点。

影响人类健康和生活质量。传统的口服降糖药物和注射胰岛素治疗不能从根本上治愈该疾病,也不能完全阻止其并发症的发生和进展。胰岛移植可补充患者体内胰岛 β 细胞数量的不足,重建胰岛 β 细胞总量的稳态平衡,既能有效控制血糖,又可能防止或逆转糖尿病并发症,故被认为是治愈糖尿病的潜在希望。2000年,胰岛移植取得了突破性进展,来自加拿大Edmonton的研究小组改良了抗免疫排斥的用药方案,取得连续7例胰岛移植的成功,可使1型糖尿病患者完全停用胰岛素治疗超过1年以上^[1]。然而,供体胰岛组织来源不足和免疫排斥反应限制了胰岛移植的广泛开展。干细胞研究的兴起为解决上述难题提供了新思路。将干细胞扩增并诱导分化为胰岛细胞将成为解决供体胰岛组织来源不足的希望所在,而采用患者特异性干细胞策略则有望克服免疫排斥的难题。

1 干细胞的研究概况

干细胞是机体及其各种组织细胞的初始来源,其最为显著的生物学特征是既有自我更新和不断增殖的能力,又有多向分化的潜能。干细胞根据不同的来源可分为胚胎干(embryonic stem, ES)细胞、诱导性多潜能干(induced pluripotent stem, iPS)细胞及成体干细胞。

1.1 ES细胞 ES细胞是从着床前的早期胚胎(囊胚)内细胞团中分离得到的干细胞,理论上可以分化为机体内几乎所有的组织细胞类型^[2,3]。ES细胞具有以下特征:(1)体外培养条件下具有强大的增殖能力,并且保持稳定的正常二倍体染色体核型和带型;(2)具有较高的端粒酶活性,可长期保持高度未分化状态;(3)具有多向分化潜能,在体内和体外条件下均可向内、中、外三个胚层的细胞分化,也可被定向诱导分化为体内各种类型的组织细胞^[2]。

1981年,ES细胞的分离和培养首先在小鼠中获得成功^[3],是至今研究最广泛、最成熟的干细胞体系。随后,牛、羊等大动物的ES细胞分离和培养也相继获得成功。1998年,人类ES(human ES, hES)细胞系首次被成功建立^[2],推动了新一轮干细胞研究热潮的兴起。目前,hES细胞已被证实可定向分化为神经细胞、骨细胞、心肌细胞等机体几乎所有的细胞类型。因此,理论上可以在体外大量扩增hES细胞并将其诱导分化为胰岛样细胞,从而为糖尿病患者的细胞替代治疗(cell replacement therapy, CRT)提供种子细胞。

hES细胞研究面临着许多难题和争议:hES细胞建系必须摧毁人类早期胚胎,存在剧烈的伦理学争议,故建系所需要的胚胎来源比较有限;hES细胞来源的细胞移植到体内后有发展为肿瘤的潜在风险;宿主对hES细胞来源的细胞存在免疫排斥。针对以上问题,各国建立了相关的法律法规,对ES细胞的胚胎来源和相关获取流程给予明确的规定;同时,采取胚胎单卵裂球法、孤雌生殖等方法获取ES细胞也有一些突破^[4]。肿瘤的形成风险通常是由于诱导分化后细胞的不成熟或混杂有较为原始的细胞所致,这一问题的解决主要依赖于提高诱导分化细胞的成熟度、对目的细胞进行纯化或导入“自杀基因”以去除未分化细胞。解决ES细胞免疫排斥的主要策略有:应用免疫抑制剂或采取免疫隔离措施;诱导免疫耐受;建立hES细胞库,进行主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)配型;进行基因工程改造或修饰以适应宿主的需求;建立体细胞核移植的hES细胞。

1.2 iPS细胞 2006年,来自日本的研究小组将Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4等4个转录因子导入小鼠成纤维细胞,获得了类似于小鼠ES细胞的多潜能干细胞,并将其命名为iPS细胞^[5]。该研究首次证实,既往认为处于终末分化的成熟细胞可以被重编程而恢复多向分化潜能。这一成果引起了整个生命科学领域的广泛关注。2007年,美国和日本两个研究小组几乎同时宣布成功获得了人类iPS细胞^[6,7]。目前,小鼠、大鼠、猪、猴、人等不同物种的iPS细胞都已成功建系。iPS细胞与ES细胞在许多生物学特征方面存在高度的相似性,其中包括细胞形态、生长特性、表面标志物、注射到裸鼠皮下可形成包含3个胚层组织结构的畸胎瘤等^[5]。此外,其在DNA甲基化、基因表达谱、染色质状态、形成嵌合体动物等方面也与ES细胞完全相似^[8]。

在hES细胞研究面临剧烈的伦理学争议的情况下,iPS细胞研究异军突起,不仅避开了伦理和法律上的争论,也使CRT的免疫排斥反应问题得到了合理的解决。但是iPS细胞面临的最大难题是逆转录病毒或慢病毒载体导致肿瘤发生的潜在风险和转染基因可能给机体带来的不利影响;其次,体细胞重编程的具体过程和作用机制尚不十分明确;再次,iPS细胞的制备效率仍然有待提高。

然而,iPS细胞存在无可比拟的优势和潜在的应用价值,故在干细胞研究领域掀起了一次

次研究热潮。现今, iPS细胞的制备技术已显著提高, 为避免最初制备方法中原癌基因*c-myc*和*Klf4*导致肿瘤的潜在风险, 已报道采用组蛋白去乙酰化酶的抑制剂丙戊酸, 从而使仅用*Oct4*和*Sox2*两个转录因子就可将原代人类成纤维细胞重编程为iPS细胞^[9]。最近, 采取mRNA转染技术即可将人类皮肤成纤维细胞等多种细胞类型重编程为iPS细胞, 消除了基于DNA载体与宿主整合技术所引发的相关风险^[10], 并且该方法显著提高了iPS细胞的制备效率。此外, 已成功建立了来源于脐带血的iPS细胞, 降低了成体细胞随着器官寿命的延长和环境暴露而积累突变的可能性^[11,12]。上述结果表明, 通过体外基因转染技术制备个性化的自体多潜能干细胞是可行的。不难预测, 基于hES细胞的研究积淀, iPS细胞在应用基础研究中必将为CRT和再生医学的发展带来更大的希望。

1.3 成体干细胞 成体干细胞是存在于机体某个组织或器官中的干细胞。其中骨髓造血干细胞的应用研究最为成熟, 最初用于治疗血液系统疾病。20世纪60年代, 随着分离、鉴定及功能研究等方面的突破, 造血干细胞移植的适应证明显增加^[13]。90年代末, 有报道显示, 源自成体骨髓的干细胞可分化为其他胚层的组织细胞^[14-16], 开阔了人们对成体干细胞分化潜能的认识。随后, 肝脏、心脏、脑等不同部位成体干细胞的发现和跨胚层分化的研究报道频繁出现^[17-19]。目前在几乎所有的组织或器官中均可发现特异性成体干细胞的存在。在通常情况下, 成体干细胞倾向于分化为自身组织的细胞类型, 维持组织细胞在生长、发育、妊娠、肥胖、创伤等各种应激下的动态平衡。成体干细胞有三大生物学特征: (1)注入体内后有明显的趋化性, 可主要集中在到达受损伤的部位; (2)在损伤部位局部微环境的诱导下, 可向损伤组织修复所急需的细胞类型分化, 促进损伤组织的修复^[20]; (3)注入体内后很少形成肿瘤。对于临床应用而言, 可从浅表组织或容易获取的组织中分离患者的自体干细胞, 如从脂肪组织分离脂肪干细胞、从骨髓或外周血分离造血干细胞等, 进而诱导定向分化为所需的细胞类型。成体干细胞研究目前面临的主要困惑有: 数量较少, 增殖能力有限; 缺乏特异性标记分子, 分离、鉴定及纯化比较困难; 分化能力有限, 并且具有较大变异度; 缺乏行之有效的定向分化方案, 分化细胞成熟度差。寻找理想的干细胞生长因子, 促进干细胞在体外增殖, 可

以弥补体内成体干细胞数量稀少的不足; 明确调控胚胎发育中的关键信号分子, 有助于寻找成体干细胞特异性的标记分子; 对体外诱导分化方案进行优化, 可望提高分化效率和分化细胞的成熟度。然而, 目前在这些方面尚缺少重大的技术突破。

2 干细胞治疗糖尿病的主要策略及其潜在机制

2.1 干细胞治疗糖尿病的主要策略 干细胞治疗糖尿病目前有两种思路: 一是在实验室条件下将干细胞诱导分化为胰岛样细胞后再移植至体内; 二是直接移植干细胞或干细胞巢居的组织。值得关注的是, 干细胞技术在研究胰腺的胚胎发育、糖尿病的发病机制、药物筛选、基因治疗等方面也具有潜在的应用价值, 是糖尿病治疗学研究的有力工具。

2.2 干细胞治疗糖尿病的潜在机制 胰岛β细胞总量丢失和胰岛素分泌功能障碍是糖尿病发生的主要机制。1型糖尿病患者因自身免疫损伤, 胰岛β细胞数量进行性丧失, 因此补充胰岛β细胞数量是一种潜在的治疗方法。2型糖尿病晚期也存在严重的胰岛素分泌功能缺陷, 故补充足量的胰岛β细胞亦能恢复正常的血糖水平。利用干细胞治疗糖尿病的主要理论依据是干细胞具有强大的增殖能力和向胰岛素分泌细胞分化的潜能, 从而为机体补充胰岛β细胞数量, 重建内源性胰岛素分泌功能。

此外, 成体干细胞移植治疗糖尿病还可能存在其他的作用机制。例如, 间充质干细胞移植可纠正胰岛内的免疫损伤, 重建胰岛局部的免疫平衡, 从而达到治疗1型糖尿病的作用^[21]。间充质干细胞还可能释放各种细胞生长因子, 促进胰岛β细胞的增殖和(或)胰腺干细胞的分化^[22]。

3 干细胞定向分化为胰岛样细胞的研究进展

利用干细胞体外诱导分化的策略将有望为糖尿病患者提供具有内分泌功能的胰岛细胞, 为糖尿病治疗学的进步提供了潜在的希望。

3.1 ES细胞定向分化为胰岛样细胞 在体外诱导分化为胰岛素分泌细胞的研究中, ES细胞是目前研究最为深入的干细胞类型。2001年, Assady等^[23]首次报道了hES细胞所形成的拟胚体中有1%-3%细胞呈胰岛素阳性染色, 证实hES细胞可自发分化为胰岛素分泌细胞。为了获得较高比例的胰岛素分泌细胞, 人们采取了多种体外定

■相关报道
Zhang等同样也成功将人类iPS细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞, 胰岛素阳性染色细胞比例高达25%。

■创新盘点

本文较为全面、详尽地阐述了3种干细胞的研究成果,并在研究进展、各自优缺点、分化方案等方面进行总结和对比,对干细胞技术治疗糖尿病的基础研究和临床应用均具有一定的指导作用。

向诱导分化的策略,其中包括:(1)利用基因工程技术将胰岛发育过程中重要的转录调控因子导入ES细胞中,启动其定向分化;(2)在培养体系中添加各种生物因子或小分子,模拟体内胰岛的发育过程,诱导形成胰岛素分泌细胞;(3)采用胰岛 β 细胞系、胎儿胰岛或发育增殖的胰腺组织制备的条件培养基进行干预或直接与上述组织或细胞共培养或共移植,可诱导ES细胞定向分化为胰岛素分泌细胞。

干细胞的定向分化依赖于特定转录因子的存在,因此在胰岛发育过程中起关键作用的转录因子如神经元素-3(neurogenin 3, Ngn3)、配对盒因子-4(paired box4, Pax4)、胰十二指肠同源盒因子-1(pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1)等可以诱导或加速ES细胞向胰腺前体细胞和(或)胰岛样细胞分化。Soria等^[24]利用直接转染胰岛素原基因的方法,诱导小鼠ES细胞定向分化为胰岛素分泌细胞。随后多项研究显示,采取Pax4^[25]、PDX1^[26]、Nkx2.2^[27]等基因的转染技术可促进ES细胞向胰岛素分泌细胞分化。Kwon等^[28]则报道采用体外蛋白质转导技术,将PDX1蛋白导入到hES细胞内,PDX1激活下游靶基因,促使hES细胞分化为胰岛素分泌细胞。将上述诱导分化获得的胰岛素分泌细胞移植到糖尿病小鼠模型体内后具有不同程度的降糖效应,甚至可以使血糖水平恢复正常^[24,25]。

干细胞的定向分化还需要来自细胞与细胞之间相互作用的关键性信号以及相互交错的分化阶段。基于这一思想,在ES细胞分化过程中使用不同的培养基、细胞外基质以及生物因子等改变其生长条件,采取分阶段诱导的方式可将ES细胞定向分化为胰岛样细胞。2001年,Lumelsky等^[29]首次建立了稳定的5步法体外定向诱导分化方案(ES细胞扩增→形成拟胚体→选择巢蛋白阳性细胞→胰腺内分泌前体细胞扩增→诱导向胰岛素分泌细胞分化),可将小鼠ES细胞在体外先后诱导分化为巢蛋白阳性前体细胞和胰岛素分泌细胞,后者在体外可自动形成胰岛样结构。这些胰岛素分泌细胞移植后可以在糖尿病小鼠体内存活,但是降低血糖的效应非常有限。2002年,Hori等^[30]在此方案的基础上添加3-磷酸肌醇激酶抑制剂可促使小鼠ES细胞分化为胰岛素分泌细胞,并聚集成胰岛样结构,其体外胰岛素释放反应呈葡萄糖依赖性,将其移植到糖尿病小鼠体内可升高胰岛素水平、缓解体质量下降、改善血糖控制以及完全避免动物死亡。

该方案主要基于胰岛 β 细胞与神经上皮在发育学方面的相似性,在神经上皮发育中瞬时表达的巢蛋白也被认为在胰岛前体细胞中表达,通过“胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠”培养基筛选获得巢蛋白阳性细胞,从而诱导ES细胞定向分化为胰岛素分泌细胞。然而,目前对于将这些细胞作为胰岛 β 细胞的前体细胞存有明显的争议。巢蛋白阳性细胞可能是神经前体细胞,而且检测到的胰岛素有可能来自诱导分化培养过程中凋亡细胞摄取培养基中的胰岛素而非来自内源性胰岛素合成^[31]。因此,为了避免单独采用胰岛素染色可能出现分化鉴定结果的假阳性,必须结合多种其他的检测方法,如C-肽染色和释放试验、电子显微镜观察分泌颗粒、移植实验证实能逆转动物模型的高血糖超过1 mo等。

晚近,模拟体内胰岛 β 细胞发育过程是最常采用的定向诱导分化策略。2006年,D'Amour等^[32]报道了改良的5步法体外诱导定向分化方案(即hES细胞→定型内胚层→肠管内胚层→胰腺内胚层和内分泌前体细胞→表达激素的内分泌细胞)可将hES细胞诱导分化为能够产生胰岛素、胰高糖素、生长抑素、胰多肽及Ghrelin的胰腺内分泌细胞,这些细胞的胰岛素合成接近成人胰岛的水平,但C-肽释放能力仅类似于胎儿胰岛 β 细胞。将该诱导方案中胰腺内胚层阶段的细胞移植到糖尿病小鼠体内后,移植细胞可在体内进一步分化成熟,这些移植物在特异性转录因子表达、胰岛素原加工、成熟分泌颗粒等方面表现出功能性胰岛 β 细胞的特征,不仅能够分泌胰岛素和C-肽,而且可发挥明显的降血糖效应^[33]。随后的研究证实,上述方案中的诱导因子活化素A(activin A)和全反式维甲酸在hES细胞向定型内胚层分化和随后向胰腺内分泌前体细胞分化中分别发挥了至关重要的作用,并且分化后的胰岛素分泌细胞移植到糖尿病小鼠体内具有明显的降血糖效应^[34,35]。另有报道显示,一些小分子化合物也可调控ES细胞的分化,如定型内胚层诱导因子1(inducer of definitive endoderm 1, IDE1)和IDE2可成功诱导小鼠ES和hES细胞向定型内胚层分化,效率要高于活化素A^[36],利用小分子物质Indolactam V可促进定型内胚层细胞高效率地转化为胰腺前体细胞^[37],这为ES细胞向胰岛样细胞的分化提供了新思路。此外,采用小鼠胚胎胰芽制备含有可溶性因子的条件培养基^[38],或者与小鼠 β 细胞株共培养^[39],可在体外诱导小鼠ES细胞定向分化为胰岛素分

泌细胞. 采用大鼠胰腺部分切除后的再生胰腺组织制备的条件培养基, 可诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为胰岛素分泌细胞^[40]. 与成年小鼠离体胰岛、离散胰岛细胞或小鼠 β 细胞株共培养, 可促进胰腺干细胞分化为成熟 β 细胞^[41]. 上述结果提示, 发育和增殖中的胰岛组织存在能够促进干细胞向胰岛 β 细胞分化的重要诱导因子. 另一方面, hES细胞分化而来的胰腺前体细胞与小鼠胚胎背胰共移植到免疫缺陷小鼠体内, 可进一步分化为胰岛 β 细胞样结构^[42]. 同样, 人类胰腺前体细胞与胎儿胰岛细胞共移植到免疫缺陷小鼠肾囊中也可见到相似的现象^[43]. 上述结果提示, 干细胞与其分化微环境之间的相互作用是决定干细胞向胰岛 β 细胞分化和成熟的关键因素. 因此, 条件培养基、与胰岛组织共培养甚或共移植等方法有望成为诱导ES细胞进一步分化成熟的新策略.

上述有关诱导hES细胞定向分化为胰岛素分泌细胞的研究距离临床应用尚有一定距离. 首先, 这些分化方案本身面临着以下技术瓶颈: 诱导分化效率低且不稳定; 分化方案并非适合所有的ES细胞系; 分化细胞的成熟度低, 大多属于胰腺前体细胞或相当于胎儿胰岛细胞, 需要进一步诱导成熟. 其次, 对于应用研究而言, 更为重要的是患者对hES细胞分化而来的各种细胞和组织存在免疫排斥反应. 制备患者特异性自体干细胞是解决免疫排斥问题的根本出路, 其技术策略包括: 体细胞核移植来源的ES细胞; 体细胞重编程产生的iPS细胞; 从容易获取的组织中分离得到的自体成体干细胞.

3.2 体细胞核移植来源的ES细胞定向分化为胰岛样细胞 采用体细胞核移植(somatic cell nuclear transplantation, SCNT)技术将患者体细胞核注入供体去核卵母细胞, 在体外激活形成克隆胚胎, 培养至囊胚阶段, 分离携带有患者基因型的hES细胞, 进而在体外诱导分化为特定类型的自体组织细胞用于疾病治疗, 此即治疗性克隆. 2007年, Byrne等^[44]首次报道在非人灵长类动物猕猴中建立SCNT来源的ES细胞系. 2008年, French等^[45]成功获得了人类SCNT来源的囊胚. 基于既往在hES细胞定向分化研究中的经验积累, SCNT来源的hES细胞一旦成功建系, 其相应的应用研究必将迅速开展.

理论上, 通过治疗性克隆技术制备患者特异性的胰岛素分泌细胞是解决胰岛移植中供体短缺和免疫排斥等难题最有希望的途径, 但治

疗性克隆研究存在着诸多难题, 除了hES细胞研究面临的共性问题 and 争议以外, 通过SCNT建立hES细胞系的技术不成熟, 需耗费太多的人类卵母细胞, 有导向生殖性克隆的潜在风险等问题制约了该技术的发展. 因此, 治疗性克隆距离临床应用尚需假以时日.

3.3 iPS细胞定向分化为胰岛样细胞 基于iPS细胞与ES细胞极大的相似性以及ES细胞定向分化研究中深厚的技术积淀, iPS细胞的应用基础研究得以迅速开展. Alipio等^[46]将小鼠皮肤成纤维细胞制备的iPS细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞, 将这些细胞经肝脏门静脉注入1型和2型糖尿病小鼠体内, 可提高胰岛素释放水平, 改善小鼠的高血糖状态, 糖化血红蛋白(HbA1c)水平亦趋于正常. 上述结果表明, iPS细胞治疗糖尿病已经在动物模型中取得成功. 2008年, Tateishi等^[47]报道将人类iPS细胞成功诱导分化为胰岛素分泌细胞, 其与hES细胞来源的胰岛素分泌细胞在细胞形态、基因和蛋白表达谱、葡萄糖刺激的胰岛素释放反应等方面是相似的. Zhang等^[48]同样也成功将人类iPS细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞, 胰岛素阳性染色细胞比例高达25%. 2008年, Park等^[49]建立了多种疾病特异性的iPS细胞系, 其中包括1型糖尿病患者来源的iPS细胞系. 2009年, Maehr等^[50]将1型糖尿病患者特异性的iPS细胞成功诱导分化为胰岛素分泌细胞. 然而, 人类iPS细胞来源的胰岛素分泌细胞移植到糖尿病动物模型体内是否具有降糖作用需要进一步验证. iPS细胞不仅可能解决胰岛移植治疗存在的供体组织来源不足和免疫排斥问题, 而且提供了很好的疾病研究模型, 有助于对糖尿病的病因学和发病机制进行探索, 还可在抗糖尿病新药研发中作为药物筛选的工具. 因此, iPS细胞在糖尿病领域的应用基础研究中已初步显示了良好的前景, 但距离最终的临床应用还有很长的路要走. 存在的问题包括: 不同的iPS细胞系之间可能存在定向分化能力的差异, iPS细胞分化而来的胰岛样细胞用于临床治疗的安全性尚不清楚.

3.4 成体干细胞定向分化为胰岛样细胞

3.4.1 胰腺干细胞: 胰腺干细胞在特定条件下优先分化为胰腺组织的细胞类型, 因此诱导胰腺干细胞定向分化是获得胰岛 β 细胞较为直接的途径. 目前, 有关胰腺干细胞的存在部位和分子标志物尚无一致意见. Zulewski等^[51]将大鼠胰岛中巢蛋白阳性的胰腺干细胞诱导形成胰腺内分泌和外分泌细胞. Inada等^[52]采用谱系示踪的方

■应用要点

本文有助于提高对干细胞研究领域的认知, 有助于了解干细胞在糖尿病治疗中的地位.

■同行评价

本文阐述了各种干细胞的优势和目前亟待解决的问题,对基础研究有一定的指导作用,对未来干细胞用于临床也有一定的启发。

法证实碳酸酐酶 II(carbonic anhydrase, CA II)阳性的胰导管细胞在出生后和胰腺受损的情况下可形成胰岛和腺泡细胞。Xu等^[53]则发现导管结扎诱导的胰腺新生源于导管内Ngn3阳性的细胞,并且发现这些细胞在体外可分化为功能性胰岛细胞。Zou等^[54]在国际上首次从灵长类糖尿病动物模型的胰腺中分离和培养了胰腺前体细胞,并成功在体外将这些前体细胞进行扩增和诱导分化为功能性胰岛细胞。Bonner-Weir等^[55]将混合培养的成人胰导管上皮样干细胞诱导形成胰岛样细胞团。Gao等^[56]将表达细胞角蛋白19(cytokeratin, CK19)的成人胰导管来源的干细胞诱导分化为胰岛样细胞,这些细胞具有葡萄糖刺激的胰岛素分泌反应,移植到裸鼠肾囊区可分化为胰腺的内分泌和外分泌细胞。本课题组在既往的研究中从胎儿胰腺组织中分离并建立了单克隆胰腺前体细胞,该细胞在体外具有很强的增殖能力,并可分化为胰岛样细胞^[57]。

理论上可尝试从糖尿病患者的胰腺中获取胰腺干细胞,并在体外进行扩增培养、诱导分化形成新的胰岛样细胞,最后再将这些细胞移植入患者体内。目前人类胰腺干细胞研究的主要困惑有:缺乏特异性标志分子,分离、纯化及鉴定比较困难;体外诱导分化方案各不相同,研究结果差异较大;分化所得到的胰岛内分泌细胞数量有限,细胞的成熟度较差,胰岛素含量和葡萄糖刺激后的胰岛素分泌量均明显低于正常,不能完全实现胰岛素分泌的生理性调节,故其临床应用前景尚需验证。

3.4.2 生殖干细胞: 精原干细胞(spermatogonial stem cells)是一种具有高度自我更新能力和分化潜能的成体干细胞,存在于成体睾丸内,具有终身的有丝分裂能力,进行自我复制的同时也可分化成单倍体精子。研究证明,从成人睾丸中得到的精原干细胞与hES细胞在细胞生物学和分子生物学特征上极为相似^[58]。相对于其他类型的成体干细胞,精原干细胞的分化潜能较大,为成体干细胞的应用开创了更广阔的空间。在今年的美国细胞生物学会50周年年会上有报道可直接从人类睾丸组织中分离出精原干细胞,并诱导分化为胰岛素分泌细胞,这些细胞表达胰岛细胞特异性标志物,并且可降低糖尿病小鼠的血糖水平。由于这类干细胞来自男性患者自身,诱导分化所获得的胰岛样细胞能够解决1型糖尿病男性患者进行胰岛移植的胰岛细胞来源和免疫排斥问题。同样,女性的卵母细胞可能也具有与精原干细胞相似的特征和潜能。

3.4.3 骨髓干细胞治疗糖尿病-定向分化或其他作用: 骨髓干细胞包含造血干细胞、间充质干细胞、内皮祖细胞等多种干细胞亚群,具有多向分化的潜能^[59]。骨髓干细胞是一种被广泛研究和应用的成体干细胞,采用患者自体的骨髓干细胞进行移植可克服免疫排斥问题。

体外研究和动物实验显示,骨髓来源的干细胞在体外和体内均可分化为胰岛素分泌细胞,这些细胞具有类似胰岛的形态结构,可表达胰岛素、胰高糖素等胰岛特异性基因产物,具有成熟 β 细胞的超微结构,存在葡萄糖刺激的胰岛素分泌反应,移植后具有降血糖效应^[60,61]。骨髓干细胞移植可促进小鼠受者胰岛细胞的增殖,使得胰岛素分泌细胞的数量增多,胰岛结构改善,胰岛素分泌量增多^[62,63]。在自身免疫性糖尿病发病之前进行骨髓移植可阻止非肥胖糖尿病(nonobese diabetic, NOD)小鼠发生糖尿病^[64,65]。此外,国内学者从1型糖尿病和2型糖尿病患者中获得骨髓间充质干细胞,并在体外诱导分化为功能性胰岛样细胞^[66]。上述研究提示,应用患者自体骨髓干细胞治疗糖尿病具有一定的科学依据。

2007年, Voltarelli等^[67]的研究显示,在15例没有糖尿病酮症酸中毒病史的新诊断1型糖尿病患者中,给予大剂量免疫抑制剂后进行自体非清髓造血干细胞移植(autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation, AHST), 14例停用胰岛素注射,最长达35 mo,其中13例HbA1c水平维持在7%以下;移植后6 mo C-肽释放反应比移植前明显增加, 12和24 mo时几乎保持不变。2009年,该研究小组增加病例数至23例,并延长了随访时间,观察到在胰岛素停用或减量的同时, C-肽水平显著升高,并可长期保持^[68]。上述结果提示, AHST可改善1型糖尿病患者的胰岛 β 细胞功能和血糖控制。Estrada等^[69]在25例2型糖尿病患者中进行胰腺动脉内输注自体骨髓干细胞与高压氧联合治疗,每3 mo随访1次, 1年后患者的代谢控制较基线显著改善,表现为空腹血糖和HbA1c显著降低,空腹C-肽和C-肽/血糖比值明显升高,胰岛素需要量减少,而体质量指数保持不变。Bhansali等^[70]采用选择性胃十二指肠动脉内输注自体骨髓干细胞治疗10例需要胰岛素治疗的2型糖尿病患者, 7例患者达到首要终点,即胰岛素剂量减少 $\geq 50\%$ 判断为有疗效, 3例患者可以完全脱

离胰岛素, 平均HbA1c下降1.0%, 其中在7例有疗效患者中有3例HbA1c<7%。在整组和有疗效组中, 空腹和胰高糖素刺激的C-肽水平均显著改善, 稳态模型评估(homeostatic model assessment, HOMA)方法计算的 β 细胞功能指数显著升高, 胰岛素抵抗指数则无明显改变。上述结果提示, 自体骨髓干细胞移植在2型糖尿病患者中可能改善胰岛 β 细胞功能。

自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病虽然在小规模临床试验中已取得了初步的成果, 但长期有效性和安全性尚需在大规模随机对照临床试验中加以验证, 其治疗作用机制同样也需要进一步探讨。

3.4.4 其他成体干细胞: 肝脏干细胞、神经干细胞、小肠干细胞等多种成体干细胞亦可诱导分化为胰岛样细胞。然而, 体外培养条件下制备的胰岛样细胞通常缺乏胰岛细胞正常发育所必需的某些信号, 导致这类细胞存在部分功能缺失, 例如, 无法合成成熟的胰岛素、缺乏对葡萄糖的反应性等。

4 结论

重建糖尿病患者体内的功能性胰岛 β 细胞总量的稳态是治疗糖尿病的理想目标, 干细胞研究的飞速发展是糖尿病患者的CRT提供了诱人的应用前景。hES细胞是目前研究最广泛、最成熟的干细胞体系, hES细胞向胰岛细胞分化的研究为CRT提供了重要的技术积淀, 但其面临剧烈的伦理学争议及移植后存在的免疫排斥反应等难题, 故距离临床应用尚有一定距离。SCNT来源的hES细胞理论上可同时解决供体组织短缺和免疫排斥反应两大难题, 但目前尚未成功建系, 且同样也存在伦理学争议。人类iPS细胞具有与SCNT来源的hES细胞相似的特点, 且避开了伦理学争议。此外, 可建立疾病特异性的iPS细胞系, 有助于对病因学和发病机制的探讨, 还可作为药物筛选的工具。患者自体的成体干细胞亦不存在伦理和免疫排斥问题, 同时成瘤风险低的特性使其成为目前临床应用研究的焦点。胰腺干细胞、生殖干细胞、骨髓干细胞等在体外均可分化为胰岛细胞。自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病在小规模的临床试验中初步显示了一定的疗效, 但长期有效性和安全性尚需进一步验证。

目前干细胞治疗糖尿病正处于基础理论和关键技术亟待突破的阶段, 要达到最终的

临床应用仍需假以时日。首先, 如何有效诱导干细胞向胰岛样细胞分化的关键技术问题还没有彻底解决。其次, CRT的研究成果目前大多数是在啮齿类动物模型中得到的, 有待在高等动物中进行验证。再次, 干细胞来源的胰岛样细胞用于治疗糖尿病的安全性尚不清楚。当前迫切需要开展的工作包括: 明确调控胰腺和胰岛 β 细胞正常胚胎发育的关键信号分子; 发现促进胰岛 β 细胞分化的特异性分子, 对体外诱导分化方案进行优化; 对CRT治疗糖尿病进行严格的有效性和安全性评价; 针对干细胞治疗糖尿病的临床应用问题制定合理的操作规程和管理规范。

5 参考文献

- 1 Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238
- 2 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147
- 3 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156
- 4 Sung LY, Chang CC, Amano T, Lin CJ, Amano M, Treaster SB, Xu J, Chang WF, Nagy ZP, Yang X, Tian XC. Efficient derivation of embryonic stem cells from nuclear transfer and parthenogenetic embryos derived from cryopreserved oocytes. *Cell Reprogram* 2010; 12: 203-211
- 5 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676
- 6 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872
- 7 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318: 1917-1920
- 8 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313-317
- 9 Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1269-1275
- 10 Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*

- 2010; 7: 618-630
- 11 Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodríguez-Pizà I, Vassena R, Raya A, Boué S, Barreiro MJ, Corbella BA, Torrabadella M, Veiga A, Izpisua Belmonte JC. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 353-357
- 12 Haase A, Olmer R, Schwanke K, Wunderlich S, Merkert S, Hess C, Zweigerdt R, Gruh I, Meyer J, Wagner S, Maier LS, Han DW, Glage S, Miller K, Fischer P, Schöler HR, Martin U. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 434-441
- 13 Hołowiecki J. Indications for hematopoietic stem cell transplantation. *Pol Arch Med Wewn* 2008; 118: 658-663
- 14 Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530
- 15 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170
- 16 Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-1779
- 17 Strick-Marchand H, Morosan S, Charneau P, Krensdorf D, Weiss MC. Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 8360-8365
- 18 Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 2002; 415: 240-243
- 19 Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G, Vescovi AL. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 2000; 3: 986-991
- 20 唐佩弦. 干细胞基础研究的新进展. *基础医学与临床* 2006; 26: 28-37
- 21 Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 1759-1767
- 22 Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006; 98: 1076-1084
- 23 Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50: 1691-1697
- 24 Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49: 157-162
- 25 Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus AM. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 998-1003
- 26 Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes* 2004; 53: 1030-1037
- 27 Shiroy A, Ueda S, Ougi Y, Saito K, Moriya K, Sugie Y, Fukui H, Ishizaka S, Yoshikawa M. Differentiation of embryonic stem cells into insulin-producing cells promoted by Nkx2.2 gene transfer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4161-4166
- 28 Kwon YD, Oh SK, Kim HS, Ku SY, Kim SH, Choi YM, Moon SY. Cellular manipulation of human embryonic stem cells by TAT-PDX1 protein transduction. *Mol Ther* 2005; 12: 28-32
- 29 Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001; 292: 1389-1394
- 30 Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16105-16110
- 31 Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* 2003; 299: 363
- 32 D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1392-1401
- 33 Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 443-452
- 34 Jiang W, Shi Y, Zhao D, Chen S, Yong J, Zhang J, Qing T, Sun X, Zhang P, Ding M, Li D, Deng H. In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell Res* 2007; 17: 333-344
- 35 Shim JH, Kim SE, Woo DH, Kim SK, Oh CH, McKay R, Kim JH. Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia* 2007; 50: 1228-1238
- 36 Borowiak M, Maehr R, Chen S, Chen AE, Tang W, Fox JL, Schreiber SL, Melton DA. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 348-358
- 37 Chen S, Borowiak M, Fox JL, Maehr R, Osafune K, Davidow L, Lam K, Peng LF, Schreiber SL, Rubin LL, Melton D. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage. *Nat Chem Biol* 2009; 5: 258-265
- 38 Vaca P, Martín F, Vegara-Meseguer JM, Rovira JM, Berná G, Soria B. Induction of differentiation of embryonic stem cells into insulin-secreting cells by fetal soluble factors. *Stem Cells* 2006; 24: 258-265
- 39 Uroic DS, Baudouin G, Ferguson LA, Docherty HM, Vallier L, Docherty K. A factor(s) secreted from MIN-6 beta-cells stimulates differentiation of definitive endoderm enriched embryonic stem cells towards a pancreatic lineage. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 328: 80-86
- 40 Choi KS, Shin JS, Lee JJ, Kim YS, Kim SB, Kim CW. In vitro trans-differentiation of rat mesenchymal cells into insulin-producing cells by rat pancreatic extract. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1299-1305
- 41 Chen W, Begum S, Opere-Addo L, Garyu J, Gibson TF, Bothwell AL, Papaioannou VE, Herold KC. Promotion of beta-cell differentiation in pancreatic precursor cells by adult islet cells. *Endocrinology* 2009;

- 150: 570-579
- 42 Brolén GK, Heins N, Edsbacke J, Semb H. Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing beta-cell-like cells. *Diabetes* 2005; 54: 2867-2874
- 43 Hao E, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Lakey JR, Geron I, Monosov EZ, Barcova M, Mercola M, Levine F. Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. *Nat Med* 2006; 12: 310-316
- 44 Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, Nelson M, Sanger WG, Gokhale S, Wolf DP, Mitalipov SM. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007; 450: 497-502
- 45 French AJ, Adams CA, Anderson LS, Kitchen JR, Hughes MR, Wood SH. Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* 2008; 26: 485-493
- 46 Alipio Z, Liao W, Roemer EJ, Waner M, Fink LM, Ward DC, Ma Y. Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 13426-13431
- 47 Tateishi K, He J, Taranova O, Liang G, D'Alessio AC, Zhang Y. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2008; 283: 31601-31607
- 48 Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, Shi Y, Deng H. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res* 2009; 19: 429-438
- 49 Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochdinger K, Daley GQ. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; 134: 877-886
- 50 Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, Leibel RL, Melton DA. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 15768-15773
- 51 Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001; 50: 521-533
- 52 Inada A, Nienaber C, Katsuta H, Fujitani Y, Levine J, Morita R, Sharma A, Bonner-Weir S. Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 19915-19919
- 53 Xu X, D'Hoker J, Stangé G, Bonnè S, De Leu N, Xiao X, Van de Castele M, Mellitzer G, Ling Z, Pipeleers D, Bouwens L, Scharfmann R, Gradwohl G, Heimberg H. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 2008; 132: 197-207
- 54 Zou C, Suen PM, Zhang Y, Wang Z, Chan P, Leung PS, Zhang YA. Isolation and in vitro characterization of pancreatic progenitor cells from the islets of diabetic monkey models. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 973-984
- 55 Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7999-8004
- 56 Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O, Otonkoski T. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* 2003; 52: 2007-2015
- 57 Zhang L, Hu J, Hong TP, Liu YN, Wu YH, Li LS. Monoclonal side population progenitors isolated from human fetal pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 603-608
- 58 Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Bühring HJ, Mattheus U, Mack A, Wagner HJ, Minger S, Matzkies M, Roppel M, Hescheler J, Sievert KD, Stenzl A, Skutella T. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 2008; 456: 344-349
- 59 Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-3493
- 60 Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; 111: 843-850
- 61 Zhao M, Amiel SA, Ajami S, Jiang J, Rela M, Heaton N, Huang GC. Amelioration of streptozotocin-induced diabetes in mice with cells derived from human marrow stromal cells. *PLoS One* 2008; 3: e2666
- 62 Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, Thyssen S, Gray DA, Bhatia M. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 763-770
- 63 Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop DJ. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 17438-17443
- 64 Zorina TD, Subbotin VM, Bertera S, Alexander AM, Haluszczak C, Gambrell B, Bottino R, Styche AJ, Trucco M. Recovery of the endogenous beta cell function in the NOD model of autoimmune diabetes. *Stem Cells* 2003; 21: 377-388
- 65 Kang EM, Zickler PP, Burns S, Langemeijer SM, Brenner S, Phang OA, Patterson N, Harlan D, Tisdale JF. Hematopoietic stem cell transplantation prevents diabetes in NOD mice but does not contribute to significant islet cell regeneration once disease is established. *Exp Hematol* 2005; 33: 699-705
- 66 Sun Y, Chen L, Hou XG, Hou WK, Dong JJ, Sun L, Tang KX, Wang B, Song J, Li H, Wang KX. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 771-776
- 67 Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB, Oliveira MC, Moraes DA, Pieroni F, Coutinho M, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simões BP, Foss MC, Squiers E, Burt RK. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2007; 297: 1568-1576
- 68 Couri CE, Oliveira MC, Stracieri AB, Moraes DA, Pieroni F, Barros GM, Madeira MI, Malmegrim KC, Foss-Freitas MC, Simões BP, Martinez EZ, Foss MC, Burt RK, Voltarelli JC. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA* 2009; 301: 1573-1579
- 69 Estrada EJ, Valacchi F, Nicora E, Brieva S, Esteve C, Echevarria L, Froud T, Bernetti K, Cayetano SM, Velazquez O, Alejandro R, Ricordi C. Combined treatment of intrapancreatic autologous bone mar-

- row stem cells and hyperbaric oxygen in type 2 diabetes mellitus. *Cell Transplant* 2008; 17: 1295-1304
- 70 Bhansali A, Upreti V, Khandelwal N, Marwaha N, Gupta V, Sachdeva N, Sharma RR, Saluja K, Dutta P,

Walia R, Minz R, Bhadada S, Das S, Ramakrishnan S. Efficacy of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Stem Cells Dev* 2009; 18: 1407-1416

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

本刊讯 《世界华人消化杂志》[ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), CN 14-1260/R]是一份同行评议性和开放获取(open access, OA)的旬刊, 每月8、18、28号按时出版。具体出版流程介绍如下:

第一步 作者提交稿件: 作者在线提交稿件(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>), 提交稿件中出现问题可以发送E-mail至submission@wjgnet.com咨询, 编务将在1个工作日内回复。

第二步 审稿: 送审编辑对所有来稿进行课题查新, 并进行学术不端检测, 对不能通过预审的稿件直接退稿, 通过预审的稿件送交同行评议专家进行评议。编辑部主任每周一组织定稿会, 评估审稿人意见, 对评审意见较高, 文章达到本刊发表要求的稿件送交总编辑签发拟接受, 对不能达到本刊发表要求的稿件退稿。

第三步 编辑、修改稿件: 科学编辑严格根据编辑规范要求编辑文章, 包括全文格式、题目、摘要、图表科学性和参考文献; 同时给出退修意见送作者修改。作者修改稿件中遇到问题可以发送E-mail至责任科学编辑, 责任科学编辑在1个工作日内回复。为保证文章审稿意见公平公正, 本刊对每一篇文章均增加该篇文章的同行评议者和同行评论, 同时配有背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点和名词解释, 供非专业人士阅读了解该领域的最新科研成果。

第四步 录用稿件: 作者将稿件修回后, 编辑部主任组织第2次定稿会, 评估作者修回稿件质量。对修改不合格的稿件通知作者重修或退稿, 对修改合格的稿件送总编辑终审, 合格后发正式录用通知。稿件正式录用后, 编务通知作者缴纳出版费, 出版费缴纳后编辑部安排生产, 并挂号将缴费发票寄出。

第五步 排版制作: 电子编辑对稿件基本情况进行核对, 核对无误后, 进行稿件排版及校对、图片制作及参考文献核对。彩色图片保证放大400%依然清晰; 中文参考文献查找全文, 核对作者、题目、期刊名、卷期及页码, 英文参考文献根据本杂志社自主研发的“参考文献检测系统”进行检测, 确保作者、题目、期刊名、卷期及页码准确无误。排版完成后, 电子编辑进行黑马校对, 消灭错别字及语句错误。

第六步 组版: 本期责任电子编辑负责组版, 对每篇稿件图片校对及进行质量控制, 校对封面、目次、正文页码和书眉, 修改作者的意见, 电子编辑进行三校。责任科学编辑制作整期中英文摘要, 并将英文摘要送交英文编辑进一步润色。责任电子编辑再将整期进行二次黑马校对。责任科学编辑审读本期的内容包括封面、目次、正文、表格和图片, 并负责核对作者、语言编辑和语言审校编辑的清样, 负责本期科学新闻稿的编辑。

第七步 印刷、发行: 编辑部主任和主编审核清样, 责任电子编辑通知胶片厂制作胶片, 责任科学编辑、电子编辑核对胶片无误送交印刷厂进行印刷。责任电子编辑制作ASP、PDF、XML等文件。编务配合档案管理员邮寄杂志。

第八步 入库: 责任电子编辑入库, 责任科学编辑审核, 包括原始文章、原始清样、制作文件等。

《世界华人消化杂志》从收稿到发行每一步都经过严格审查, 保证每篇文章高质量出版, 是消化病学专业人士发表学术论文首选的学术期刊之一。为保证作者研究成果及时公布, 《世界华人消化杂志》保证每篇文章16 wk内完成。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-18)

RNA干扰Akt对食管癌细胞株Eca109生物学特性的影响

丁宗励, 施瑞华, 朱宏, 凌亭生, 郝波

丁宗励, 施瑞华, 朱宏, 凌亭生, 郝波, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

丁宗励, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤早期发病机制方面的研究。江苏省“六大人才高峰”基金资助项目

作者贡献分布: 该课题由丁宗励、施瑞华及朱宏共同设计; 研究过程由丁宗励与郝波在施瑞华指导下完成; 所用试剂及分析工具由施瑞华提供; 数据分析由丁宗励、凌亭生及郝波完成; 论文写作由丁宗励与施瑞华完成。

通讯作者: 施瑞华, 教授, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科。ruihuashi@126.com
电话: 025-83718836-6973

收稿日期: 2010-11-08 修回日期: 2010-12-28

接受日期: 2011-01-06 在线出版日期: 2011-02-18

RNA interference-mediated down-regulation of Akt attenuates cell proliferation and migration in human esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca109

Zong-Li Ding, Rui-Hua Shi, Hong Zhu, Ting-Sheng Ling, Bo Hao

Zong-Li Ding, Rui-Hua Shi, Hong Zhu, Ting-Sheng Ling, Bo Hao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Foundation of “Six Talent Peak” in Jiangsu Province

Correspondence to: Professor Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com

Received: 2010-11-08 Revised: 2010-12-28

Accepted: 2011-01-06 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of RNA interference-mediated down-regulation of Akt on cell proliferation, migration, and vasculogenic mimicry formation in human esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca109.

METHODS: Plasmids harboring small interfering RNA targeting the Akt gene were introduced into Eca109 cells by liposome-mediated transfection. The expression of Akt protein was measured by Western blot. The proliferation of Eca109 cells was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The migration of Eca109 cells was evaluated by Transwell migra-

tion assay. Vasculogenic mimicry was evaluated by counting the number of capillary structures.

RESULTS: Akt expression was markedly down-regulated in Eca109/8 cell clone (transfected with the plasmid harboring small interfering RNA targeting the Akt gene). The expression of Akt protein in Eca109/8 cells could not be detected by Western blot. The proliferation of Eca109/8 cells decreased significantly compared with untransfected Eca109 cells ($P < 0.05$). Transwell migration assay showed that less Eca109/8 cells could move through the Transwell membrane when compared with untransfected Eca109 cells (59.33 ± 2.87 vs 130.5 ± 2.22 , $P < 0.05$). Eca109 cells were capable of forming vasculogenic mimicry patterns *in vitro*. Silencing of the Akt gene could significantly suppress vasculogenic mimicry formation in Eca109 cells.

CONCLUSION: RNA interference-mediated down-regulation of Akt can attenuate the proliferation, migration, and vasculogenic mimicry formation of Eca109 cells. Blockade of the Akt pathway may provide a new approach to the treatment of human esophagus squamous cell carcinoma.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Akt; Transfection; RNA interference; Vasculogenic mimicry

Ding ZL, Shi RH, Zhu H, Ling TS, Hao B. RNA interference-mediated down-regulation of Akt attenuates cell proliferation and migration in human esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca109. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 451-456

摘要

目的: 探讨RNA干扰沉默Akt对人食管鳞癌细胞体外增殖、迁移及血管生成拟态(VM)形成的影响。

方法: 应用倒置荧光显微镜观察Akt的干扰质粒转染食管癌细胞Eca109后绿色荧光蛋白的表达; 采用Western blot方法检测Akt蛋白的表达; 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测转染前后细胞增殖能力的变化; Transwell方法检测干扰前

■背景资料

食管癌是常见恶性肿瘤之一, 食管癌多为食管鳞状上皮细胞癌(ESCC)。目前对食管癌的早期诊断率很低, 发现后多为中晚期, 目前研究结果提示食管癌是一种多基因异常疾病。Akt的活化与肿瘤的发生发展密切相关。

■同行评议者

李晟磊, 副主任医师, 郑州大学第一附属医院病理科、河南省肿瘤病理重点实验室、郑州大学医学院病理教研室

■研究前沿

PKB/Akt是细胞存活信号通路中的关键调节者,在细胞发育不同阶段所发挥的作用并不相同。PKB/Akt的研究目前已经成为细胞信号转导研究领域的一个新热点。

后细胞迁移能力的变化;取24孔培养板每孔加入300 μL Matrigel原液,待其凝固,每孔内接种1 mL浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的各组细胞悬液,培养12 h后观察并计数转染前后各组细胞的管状结构数量。

结果: Eca109/8单克隆干扰效果好, Western blot结果显示几乎无Akt表达。Akt被干扰后,细胞增殖能力明显减弱($P < 0.05$),运动迁移能力显著下降,与未转染的细胞相比穿过人工基底膜的细胞数明显减少(59.33 ± 2.87 vs 130.5 ± 2.22 , $P < 0.05$)。三维培养提示干扰后细胞的管状结构数量明显减少($P < 0.05$)。

结论: RNA干扰可引起Eca109中Akt的沉默,而Akt表达下调后食管癌细胞株Eca109的增殖与迁移能力及VM能力均减弱。推测阻断Akt通路有可能成为治疗人食管鳞癌的新靶点。

关键词: 食管鳞癌; Akt; 转染; RNA干扰; 血管生成拟态

丁宗励, 施瑞华, 朱宏, 凌亭生, 郝波. RNA干扰Akt对食管癌细胞株Eca109生物学特性的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 451-456

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/451.asp>

0 引言

食管癌是常见恶性肿瘤之一,位居第8位,世界上90%以上的食管癌多为食管鳞状上皮细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)。目前对食管癌的早期诊断率很低,发现后多为中晚期,早期转移和术后复发是造成食管癌死亡率居高不下的主要原因^[1-3]。目前研究结果提示食管癌是一种多基因异常疾病,涉及癌基因的过表达和抑癌基因的突变、缺失等多方面的异常^[4-9]。蛋白激酶B(protein kinase B, PKB),是一种相对分子质量大约为60 000 Da的蛋白激酶,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,由于这种激酶是逆转录病毒Akt8癌基因v-Akt编码的蛋白产物,故也称为Akt^[10]。PKB/Akt是磷脂酰肌醇三磷酸激酶(phosphatidylinositol trisphosphate kinase, PI3K)下游的一个靶位点,活化后的PKB/Akt在糖代谢、蛋白合成以及基因表达等过程中起着重要的调节作用^[11]。PKB/Akt是细胞存活信号通路中的关键调节者,能够促进细胞存活、抑制细胞凋亡。Akt的活化与肿瘤的发生发展密切相关,如生长因子、细胞因子、PTEN的失活和Ras的激活等均可以导致Akt的活化^[12]。本研究通过建立食管癌细胞Eca109的稳定Akt干

扰株,探讨Akt下调后对Eca109的生物学行为等方面的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人ESCC细胞株Eca109(中科院上海细胞所), pGCsi-Akt和阴性对照环质粒(上海英俊公司)为携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)报道基因,并不干扰任何内源基因的短发状RNA载体。FBS DMEM(Hyclone), LipofectamineTM 2000(Invitrogen), 克隆环(Sigma), 兔抗人Akt mAb(Cell Signal Technology), 鼠抗人 β -actin mAb(Sigma), 鼠抗人GAPDH mAb(Sigma), 人工基质Matrigel(BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染: 转染前1 d取对数生长期的Eca109细胞约 2.0×10^5 个接种于35 mm培养皿,培养于不含抗生素的DMEM培养液,次日观察细胞长至约70%-90%聚合开始转染。取pGCsi-Akt质粒4 μg 和LipofectamineTM 2000 10 μL 分别稀释于250 μL 不含抗生素的DMEM培养液,5 min内混匀,室温孵育20 min后加入培养皿。6 h后更换新鲜的含100 mL/L胎牛血清DMEM培养液,其后每2-3 d更换培养液。Eca109细胞转染后24 h按1:12的比例传代,48 h后开始用含6 mg/L杀稻瘟菌素(筛选浓度在转染前制杀伤曲线后获得)的选择性培养液进行筛选,约4 wk后挑取克隆在6 mg/L杀稻瘟菌素培养液中继续传代,扩大培养。同步转染阴性对照质粒。将转染重组质粒pGCsi-shAkt及对应的阴性对照质粒的细胞分别命名为Eca109/shRNA及Eca109/Neo。倒置荧光显微镜结合Western blot鉴定干扰效果。

1.2.2 Western blot: 细胞聚合后弃去培养液,预冷PBS洗细胞2次,加蛋白裂解液制备总蛋白,超声破碎后4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min,离心10 min,取上清。采用BCA法定量蛋白浓度。取总蛋白40 μg 于100 $^{\circ}\text{C}$ 加热变性5 min后上样,行40 mA稳流SDS PAGE电泳,100 V稳压冰浴电转至PVDF膜,50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h后TBST漂洗,5 min \times 3,加入适当浓度一抗(Akt 1:1 000, β -actin 1:4 000, GAPDH 1:8 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日TBST漂洗5 min \times 3后再加HRP标记的二抗(羊抗鼠1:5 000,羊抗兔1:3 000)室温孵育1 h, TBST漂洗5 min \times 3。ECL化学发光法显影。

1.2.3 MTT法检测转染前后Eca109的增殖: 将不同细胞株按2 000/孔接种于96孔板,与MTT(5 g/L)反应,连续7 d,最后1 d每孔加200 μL DMSO,摇床振荡15 min溶解后,在酶标仪上读取570 nm

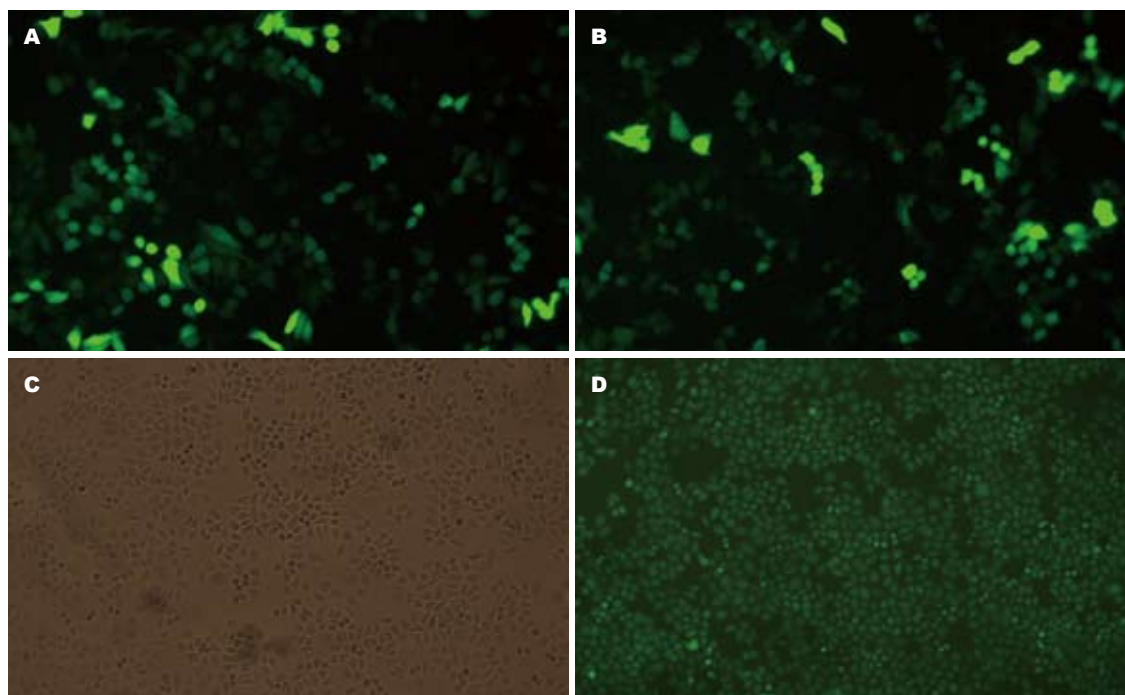


图1 瞬时及稳定转染细胞株光镜下结果. A: 瞬时转染1号质粒组(倒置荧光镜×200); B: 瞬时转染空载体组(倒置荧光镜×200); C: 稳定转染(普通光镜×100); D: 同一视野稳定转染(倒置荧光镜×100).

■ 相关报道

Sasaki等研究发现利用RNA干扰技术沉默Akt, 可能成为分子靶向治疗前列腺癌的一个有效手段. Yu等成功构建PKB/Akt基因逆转录病毒shRNA载体, 转染血管平滑肌细胞(VSMC)能够明显抑制其分裂、分化和增殖.

处的吸光度值(A 值), 计算各组的 A_{570} 均值, 绘制细胞增殖曲线.

1.2.4 Transwell实验检测转染前后Eca109的迁移能力: 采用孔径8 μm 的24孔Transwell小室(corning). 用明胶均匀涂在小室下面晾干后, 上室加 1×10^5 个细胞, 总体积为200 μL . 下室加500 μL 含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液. 24 h后甲醇固定, HE染色. 400倍光镜下随机取5个视野拍照, 计算穿膜细胞数.

1.2.5 体外三维培养观察细胞管道形成能力: 从 -20°C 中取出保存的Matrigel, 在 -4°C 下过夜使之融解成为液态. 微量移液枪头和24孔细胞培养板预先冰上预冷. 取24孔培养板每孔加入300 μL Matrigel原液, 小心摇动使之均匀分布于孔的各个部位并避免产生气泡. 所有操作必须在冰上进行. 37°C 培养箱内孵育30 min待其凝固. 用2.5 g/L胰酶消化各组细胞至单细胞悬液, 在每孔内接种1 mL浓度为 $5 \times 10^8/\text{L}$ 的各组细胞悬液, 置于常氧培养. 12 h后终止培养, 观察各组食管癌细胞的管状结构排列情况和完整程度. 随机于倒置显微镜下($\times 200$)取上、下、左、右、中心5个视野摄像记录并计数管状结构数量, 取每个视野的均值. 重复实验3次.

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件处理数据. 计量资料, 用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示. 两组数据比较采用成组 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 单克隆Eca109/8的GFP表达 经过瞬时转染鉴定后选择1号干扰质粒继续行稳定转染, 在所挑出的单克隆中, 以8号单克隆转染效果佳, 简称为Eca109/8. 该细胞株在倒置荧光显微镜下发出绿色荧光, 证实质粒已转入细胞基因组并稳定表达(图1).

2.2 Western blot检测干扰效果 Eca109/8单克隆几乎无Akt的表达, 而转染阴性对照质粒的细胞株Akt的表达与未转染的细胞无明显差异. 瞬时转染时根据Western blot鉴定结果(图2), Akt蛋白表达显著减少, 尤其以1号质粒: 干扰效率最高, 选定1号质粒行稳定转染. 3 mo后稳定表达, 成功挑出干扰效率高的8号单克隆细胞株, 即Eca109/8, 经Western blot鉴定几乎无Akt的表达(图3).

2.3 MTT法检测细胞增殖的变化 根据连续7d A 值绘制的生长趋势图提示干扰组明显低于未转染组($P < 0.05$), 而阴性对照组与未转染组无明显差异(图4).

2.4 Transwell实验结果 Akt沉默后, Eca109/8的迁移能力明显下降, 穿过人工膜的细胞数明显少与未转染组(59.33 ± 2.87 vs 130.5 ± 2.22 , $P < 0.05$), 而阴性对照组和未转染组穿膜细胞数无统计学差异(124.2 ± 2.1 vs 130.5 ± 2.22 , $P > 0.05$, 图5).

2.5 三维培养 常氧情况下, Eca109及空载体组细

■创新盘点

Akt的相关研究虽然较多,但在食管鳞癌中通过RNA干扰技术研究其功能的报道仍然尚少.本文在高度恶性食管癌细胞株Eca109中的研究结果为证实Akt的生物学作用的普遍性提供了一定的理论依据.

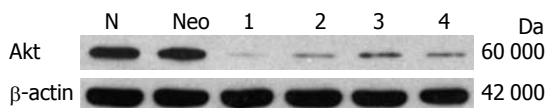


图2 Western blot检测瞬时转染细胞Eca109的Akt蛋白表达. N: 未转染组Eca109; Neo: 转染空载体组; 1-4: 不同干扰质粒组.

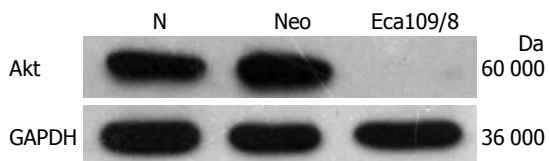


图3 Western blot检测稳定转染细胞Eca109/8的Akt蛋白表达. N: 未转染组Eca109; Neo: 转染空载体组.

胞在Matrigel上均能模拟血管内皮细胞的特性并相互连接,约12 h后形成典型的血管网状样结构(capillary structure),呈单个环状或多个环相连的网格状.稳定转染组细胞常氧情况下体外管道形成能力均被明显抑制,环状结构断裂,多为不完全封闭环形及线状结构,管状结构数目明显少于对照组($P<0.05$,图6).

3 讨论

PKB/Akt是细胞存活信号通路中的关键调节者,在细胞发育不同阶段所发挥的作用并不相同. PKB/Akt的研究目前已经成为细胞信号转导研究领域的一个新热点^[13]. RNA干扰是一种特异性基因沉默技术,是生物进化过程中基因组水平上的免疫监控机制^[14],在反向遗传学研究、细胞信号转导通路研究和某些疾病如病毒感染、肿瘤及多种遗传相关性疾病的发病机制和治疗学研究中发挥着重要作用,显示出了巨大的潜力;其具有很强的特异性,因此在基因等基础研究领域中占据着不可替代的地位^[15]. RNA干扰的机制为外源性基因随机整合到宿主基因组并利用宿主细胞进行转录时,宿主细胞常产生一些双链RNA(dsRNA),随后dsRNA被切割酶Dicer剪切为21-23 bp的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA). siRNA再与酶蛋白结合形成RNA诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),RISC根据碱基互补配对原则与靶向mRNA结合,最终导致目标mRNA降解,从而导致基因沉默^[16].

我们在以前的实验中曾经成功行RNA干扰技术沉默转录因子HIF-1 α ,获得稳定转染的细胞株^[17].在本实验中我们设计合成了4个不同序列的针对Akt1的干扰质粒pGCsi-Akt-1、pGCsi-

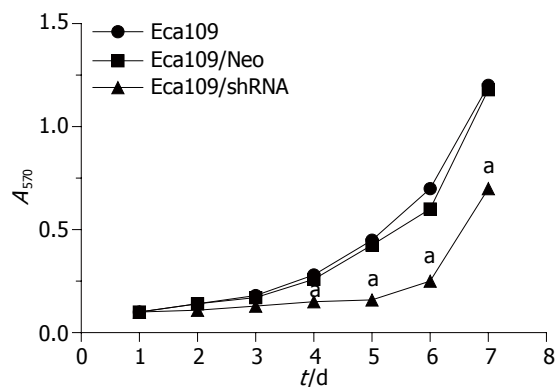
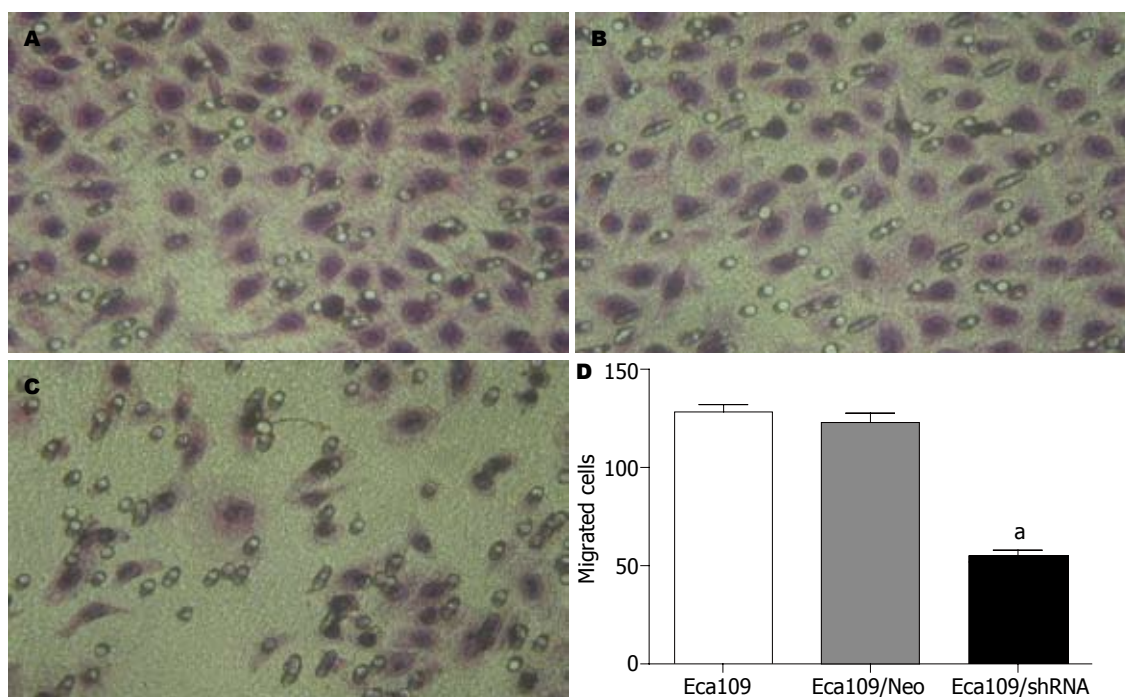


图4 MTT法检测Eca109/8细胞转染后增殖能力的变化. Eca109: 未转染组; Eca109/Neo: 转染空载体组; Eca109/shRNA: 稳定干扰组. * $P<0.05$ vs 未转染组.

Akt-2、pGCsi-Akt-3和pGCsi-Akt-4,并经过瞬时转染筛选出干扰效率较高的pGCsi-Akt-1,可见较强的绿色荧光蛋白表达,且予以蛋白水平检测提示干扰效率最高.后续实验中我们应用pGCsi-Akt-1干扰质粒稳定转染食管癌细胞Eca109,单克隆扩大培养后,倒置荧光显微镜下观察,可见Eca109/8克隆有较强的绿色荧光蛋白表达,提示质粒已整合到基因组中并稳定表达. Western blot结果显示, Eca109/8克隆几乎无Akt的表达,进一步在蛋白水平证明了干扰的效果.

目前,在哺乳动物中Akt有3种亚型,即Akt1, Akt2和Akt3^[18].其中以Akt1表达量最为丰富,除肾脏、肝脏及脾脏外,其他组织都出现高表达. Akt2表达具有组织相关性,在棕色脂肪中含量最多,其次是骨骼肌和肝脏^[19]. Akt3在脑和睾丸中含量极其丰富,而在肠道及肌肉组织中为低水平表达^[20].在多种人类肿瘤中Akt均表现为异常增多和持续性活化,且在疾病发展中AKT的活化水平逐渐增加;其中Akt1激酶活性高及高表达的肿瘤,如前列腺癌、卵巢癌和乳腺癌预后差^[21].并在卵巢癌、乳腺癌中发现Akt2表达过度的复发率高^[22,23].在前列腺癌、乳腺癌中Akt3高表达,预后差^[24].以上说明Akt与肿瘤的发生、发展、转移和预后等密切相关.我们在实验中发现, Akt被干扰后,细胞增殖速度明显减慢,细胞的迁移能力显著下降,提示Akt在食管癌的转移过程中有重要作用.我们的实验结果显示,食管癌细胞株Eca109经针对Akt的干扰质粒转染,用杀稻瘟菌素筛选后再单克隆化,经Western blot鉴定的细胞株能稳定的抑制的表达.其后的功能实验进一步提示Akt沉默后Eca109的增殖、迁移能力显著下降以及血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)^[25]发生的数量明显减少.我们知道实体肿瘤



■应用要点

本研究证实RNA干扰可以沉默食管癌细胞株Eca109的Akt表达, 抑制其增殖与迁移, 并可以影响血管生成拟态的形成, 为其将来临床应用提供了理论依据。

图 5 Transwell实验检测沉默Akt对Eca109细胞迁移能力的变化(IHE × 400). A: 未转染组Eca109; B: 转染空载体组Eca109/Neo; C: 稳定干扰组Eca109/shRNA; D: 数据统计结果分析柱状图. ^a $P < 0.05$ vs 其他两组.

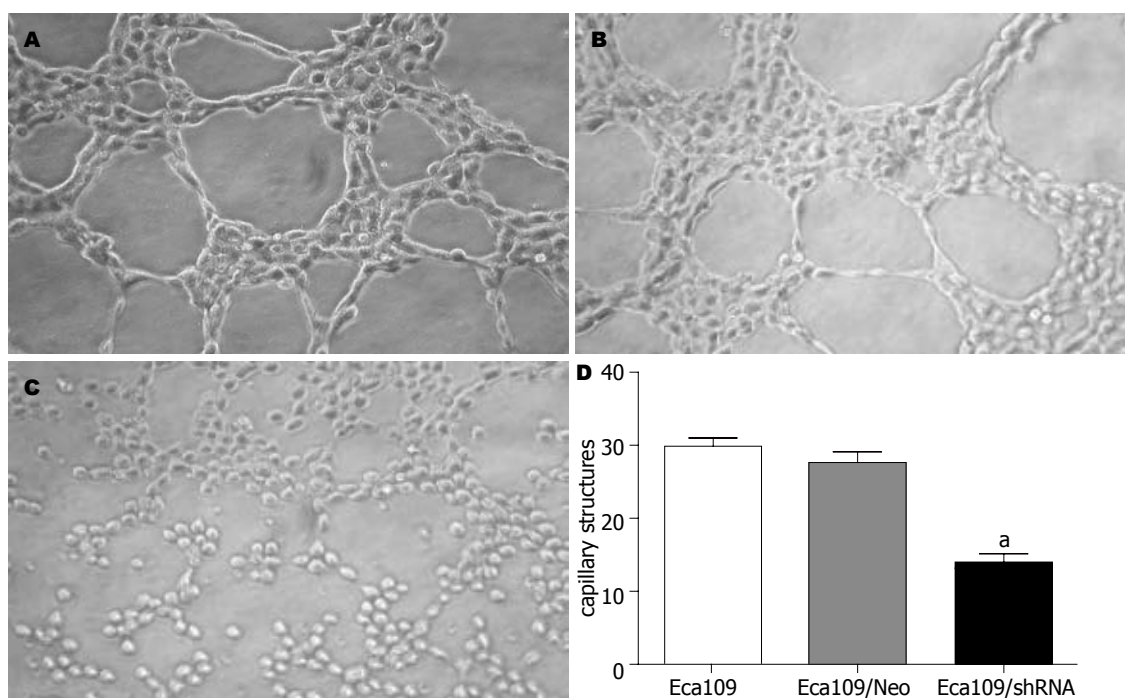


图 6 沉默Akt对Eca109细胞VM形成能力的影响(× 200). A: 未转染组Eca109; B: 转染空载体组Eca109/Neo; C: 稳定干扰组Eca109/shRNA; D: 数据统计结果分析柱状图. ^a $P < 0.05$ vs 其他两组.

的生长和转移有赖于血管的形成, 既往观点认为内皮依赖性血管是肿瘤获取血供的唯一途径. 然而, 1999年Maniotis等^[25]发现在高侵袭性黑色素瘤中, 存在一种与经典的肿瘤血管生成途径完全不同的肿瘤微循环模式-VM, 即肿瘤细胞通过自身变形围成的无内皮细胞被覆的、由细胞外基

质界定的微循环管道. 这些管道与微血管相通, 参与了肿瘤的微循环^[26]. 目前多项临床研究提示VM的存在与肿瘤早期血道转移和不良预后密切相关^[27-30]. 本研究通过体外三维培养的方式对ESCC Eca109细胞中VM现象进行观察, 使细胞在体外也能与细胞外基质相互作用, 表现出的生

■同行评价

本文设计合理, 结果可靠, 具有一定的科学价值。

物学特征与体内状态下较为接近, 避免了传统二维培养体系的局限性。三维培养结果证实食管癌细胞Eca109在Matrigel上均可形成血管网状样结构, 即VM, 而经Akt干扰后VM的能力明显减少, 本研究提示了Akt参与了血管拟态生成的调节。以上结果提示Akt在食管癌的发生、进展及转移过程中起着重要作用, 有可能成为一个潜在的肿瘤治疗靶点。

4 参考文献

- 1 The World Health Report 1997--conquering suffering, enriching humanity. *World Health Forum* 1997; 18: 248-260
- 2 Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83: 18-29
- 3 Goseki N, Koike M, Yoshida M. Histopathologic characteristics of early stage esophageal carcinoma. A comparative study with gastric carcinoma. *Cancer* 1992; 69: 1088-1093
- 4 Baylin SB. Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 331-337
- 5 Mandard AM, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mutat Res* 2000; 462: 335-342
- 6 Forastiere A, Weber R, Ang K. Treatment of head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1076; author reply 1077-1078
- 7 Kihara C, Seki T, Furukawa Y, Yamana H, Kimura Y, van Schaardenburgh P, Hirata K, Nakamura Y. Mutations in zinc-binding domains of p53 as a prognostic marker of esophageal-cancer patients. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 190-198
- 8 Stoner GD, Gupta A. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1737-1746
- 9 Xing EP, Yang GY, Wang LD, Shi ST, Yang CS. Loss of heterozygosity of the Rb gene correlates with pRb protein expression and associates with p53 alteration in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1231-1240
- 10 Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 1991; 254: 274-277
- 11 Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275: 1943-1947
- 12 Bellacosa A, Testa JR, Moore R, Larue L. A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 268-275
- 13 刘静, 徐玲, 刘云鹏, 曲秀娟, 张晔, 侯科佐, 胡雪君, 姜又红. 硼替佐米抑制PI3K/Akt通路增强胃癌细胞对TRAIL诱导凋亡的敏感性. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1854-1859
- 14 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
- 15 Leung RK, Whittaker PA. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol Ther* 2005; 107: 222-239
- 16 Tijsterman M, Plasterk RH. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* 2004; 117: 1-3
- 17 金海林, 施瑞华, 朱宏, 凌亭生, 郝波. RNA干扰HIF-1 α 对食管癌细胞株TE13的生物学特性的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2762-2766
- 18 Gonzalez E, McGraw TE. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 2009; 8: 2502-2508
- 19 Altomare DA, Lyons GE, Mitsunuchi Y, Cheng JQ, Testa JR. Akt2 mRNA is highly expressed in embryonic brown fat and the AKT2 kinase is activated by insulin. *Oncogene* 1998; 16: 2407-2411
- 20 Nakatani K, Sakaue H, Thompson DA, Weigel RJ, Roth RA. Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 906-910
- 21 Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tsichlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol* 2001; 159: 431-437
- 22 Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V, Ferrandina G, Benedetti Panici P, Mancuso S, Neri G, Testa JR. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* 1995; 64: 280-285
- 23 Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN, Testa JR. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 9267-9271
- 24 Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ, Roth RA. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem* 1999; 274: 21528-21532
- 25 Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-752
- 26 曾楷峰, 施瑞华. 血管生成拟态与肿瘤微循环. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2015-2020
- 27 Guzman G, Cotler SJ, Lin AY, Maniotis AJ, Folberg R. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1776-1781
- 28 Sun B, Qie S, Zhang S, Sun T, Zhao X, Gao S, Ni C, Wang X, Liu Y, Zhang L. Role and mechanism of vasculogenic mimicry in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 2008; 39: 444-451
- 29 Li M, Gu Y, Zhang Z, Zhang S, Zhang D, Saleem AF, Zhao X, Sun B. Vasculogenic mimicry: a new prognostic sign of gastric adenocarcinoma. *Pathol Oncol Res* 2010; 16: 259-266
- 30 Baeten CI, Hillen F, Pauwels P, de Bruine AP, Baeten CG. Prognostic role of vasculogenic mimicry in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 2028-2035

2型糖尿病中国地鼠脂肪肝相关胰岛素抵抗的形成机制

李国生, 刘栩晗, 黄澜, 朱华, 刘亚莉, 马春梅

李国生, 刘栩晗, 黄澜, 朱华, 刘亚莉, 马春梅, 大连医科大学
附属第一医院病理科 辽宁省大连市 116011

李国生, 医学博士, 主治医师, 主要从事糖尿病病因及治疗机制
方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由李国生与刘栩晗设计; 研究过程由李国
生、刘栩晗、黄澜、朱华、刘亚莉及马春梅操作完成; 研究所
用新试剂及分析工具由李国生、刘栩晗、黄澜、朱华、刘亚莉
及马春梅提供; 数据分析由李国生、刘栩晗、黄澜、朱华及刘
亚莉完成; 本论文写作由李国生与刘栩晗完成。

通讯作者: 李国生, 主治医师, 116011, 辽宁省大连市中山路222
号, 大连医科大学附属第一医院病理科. guoshengli998@163.com
电话: 0411-83635963-3253

收稿日期: 2010-10-30 修回日期: 2011-01-05

接受日期: 2011-01-11 在线出版日期: 2011-02-18

Mechanisms underlying the development of hepatic steatosis-related insulin resistance in Chinese hamsters with type 2 diabetes

Guo-Sheng Li, Xu-Han Liu, Lan Huang, Hua Zhu,
Ya-Li Liu, Chun-Mei Ma

Guo-Sheng Li, Xu-Han Liu, Lan Huang, Hua Zhu, Ya-
Li Liu, Chun-Mei Ma, Department of Pathology, the First
Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian
116011, Liaoning Province, China

Correspondence to: Guo-Sheng Li, Department of Pa-
thology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical
University, 222 Zhongshan Road, Dalian 116011, Liaoning
Province, China. guoshengli998@163.com

Received: 2010-10-30 Revised: 2011-01-05

Accepted: 2011-01-11 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To investigate the mechanisms underlying the development of hepatic steatosis-related insulin resistance in Chinese hamsters with type 2 diabetes.

METHODS: Insulin-resistant obese Chinese hamsters and Chinese hamsters with type 2 diabetes were generated by feeding a high-fat diet with or without low-dose streptozotocin. Then we investigated the alterations in hepatic gene expression profiles by microarray analysis followed by real-time RT-PCR confirmation.

RESULTS: Microarray analysis indicated that, in insulin-resistant obese Chinese hamsters and those with type 2 diabetes, differentially ex-

pressed metabolism-related genes were mainly associated with hepatic glycolipid metabolism and related signaling pathways. Real-time RT-PCR analysis verified that the expression of hepatic sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) γ was increased (all $P < 0.05$), the expression of liver X receptor α (LXR α), PPAR α , and PPAR β/δ was decreased (all $P < 0.05$), and the expression of LXR β was unchanged in the liver of hamster models. The expression of hepatic LXR α , SREBPs, PPARs and their target genes in insulin-resistant hamsters significantly differed from that in type 2 diabetic hamsters (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Altered expression of LXR α , SREBPs and PPARs may be involved in the development of hepatic steatosis-related insulin resistance in type 2 diabetic Chinese hamsters.

Key Words: Liver X receptor; Sterol regulatory element-binding protein; Peroxisome proliferator-activated receptor; Type 2 diabetes; Insulin resistance; Chinese hamster

Li GS, Liu XH, Huang L, Zhu H, Liu YL, Ma CM. Mechanisms underlying the development of hepatic steatosis-related insulin resistance in Chinese hamsters with type 2 diabetes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 457-466

摘要

目的: 研究2型糖尿病中国地鼠脂肪肝相关胰岛素抵抗的形成机制。

方法: 采用高脂饮食及结合小剂量链脲菌素(STZ)的方法建立肥胖胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病中国地鼠模型。应用基因表达芯片技术检测模型地鼠肝脏中基因表达谱的变化, 并应用实时定量PCR进行验证。

结果: 基因芯片结果显示在胰岛素抵抗地鼠和糖尿病地鼠脂肪变的肝脏中, 代谢相关差异表达的基因主要与肝脏糖脂代谢及相关信号通路和转录因子/核因子相关。PCR证实肝脏固醇调节元件结合蛋白(SREBPs)和过氧化

■背景资料

胰岛素抵抗是2型糖尿病重要的发病机制之一。脂毒性理论提出高脂饮食性肥胖发生2型糖尿病的潜在机制是异位脂沉积诱发的胰岛素敏感组织的脂肪变相关胰岛素抵抗。肝脏(胰岛素敏感组织)脂肪变相关胰岛素抵抗在2型糖尿病的形成和发展过程中发挥重要作用。

■同行评议者

徐庆, 教授, 桂林医学院药理教研室

■研究前沿

目前, 2型糖尿病脂肪肝相关胰岛素抵抗形成机制的研究主要集中在受体后缺陷方面。在激素调节的信号通路和转录因子/核因子(受体)系统及其信号通路方面的研究有助于理解其分子机制, 但其机制仍需深入的研究。

物酶体增殖体激活受体(PPAR) γ 表达升高(均 $P<0.05$), 肝X受体(LXR) α , PPAR α 和PPAR β/δ 表达降低(均 $P<0.05$), 而LXR β 的表达无改变。肝脏LXR α , SREBPs和PPARs及其靶基因的表达在两模型小鼠间存在显著差异(均 $P<0.05$)。

结论: 表达改变的LXR α , SREBPs和PPARs参与2型糖尿病小鼠脂肪肝相关胰岛素抵抗形成。

关键词: 肝X受体; 固醇调节元件结合蛋白; 过氧化物酶体增殖体激活受体; 2型糖尿病; 胰岛素抵抗; 中国小鼠

李国生, 刘翔, 黄澜, 朱华, 刘亚莉, 马春梅. 2型糖尿病中国小鼠脂肪肝相关胰岛素抵抗的形成机制. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 457-466
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/457.asp>

0 引言

在2型糖尿病的发生发展过程中胰岛素抵抗发挥重要作用。然而, 其形成机制尚未阐明。由高脂和高胆固醇饮食诱导的肥胖是2型糖尿病胰岛素抵抗常见而重要的环境因素之一^[1,2]。糖尿病脂毒性理论提出高脂和高胆固醇饮食性肥胖发生2型糖尿病的潜在机制是在胰岛素敏感组织内由异常糖脂代谢形成的异位脂沉积并造成功能异常, 即诱发脂诱发性胰岛素抵抗^[3,4]。肝脏作为胰岛素敏感组织, 在调控糖、脂和能量代谢维持正常的血糖脂浓度方面发挥独特的作用。因而, 肝脏胰岛素抵抗将有助于高血糖、异常脂血症、脂肪肝变和系统性胰岛素抵抗的发生^[5,6]。因此, 肝脏胰岛素抵抗, 尤其是脂诱发性肝脏胰岛素抵抗的形成机制是了解肥胖相关2型糖尿病病因的前提。中国小鼠具有糖尿病的遗传易感性并且在脂代谢方面与人类有很多相似的特征^[7]。因此, 我们选择中国小鼠建立肥胖胰岛素抵抗和2型糖尿病模型来模拟患者病理生理特征和发病过程。基因表达芯片技术是一种解码疾病相关复杂基因表达谱改变的有力工具。在本研究中, 我们将应用基因芯片技术来确定胰岛素抵抗和2型糖尿病小鼠脂肪肝相关胰岛素抵抗的基因表达改变和探究相应的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 中国小鼠, 雌雄各半, 40只, 清洁级, 血糖 $4.65 \text{ mmol/L} \pm 0.68 \text{ mmol/L}$, 周龄26 wk, 体重 $125 \text{ g} \pm 11.2 \text{ g}$, 购自四川省医学科学院实验动物研究所, 单笼饲养, 自由摄食饮水, 造模和观

察。高脂饲料购自军事医学科学院实验动物中心, 高能量高脂饲料的配方为: 1%胆固醇, 0.02%牛胆酸钠, 10%猪油, 10%蛋黄粉及78.98%基础饲料。诱导剂STZ购自Sigma公司。应用稳豪血糖仪监测血糖。鼠胰岛素ELISA试剂盒(Linco公司)购自吉泰公司。血三酰甘油(triglycerides, TG)试剂盒、血游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)试剂盒、血低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)试剂盒、血高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)试剂盒、血总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒(Randox公司)均购自北京九强生物技术有限公司。NucLeospin[®] Extract II和Nucleospin[®] RNA Clean-up购自德国Macherey-Nagel公司, Reverse Transcription System, T7 RiboMAX[™] Express Large Scale RNA Production System, dNTP Mix和dNTP购自Promega公司, Cy3-dCTP和Cy5-dCTP购自Amersham公司。RNA提取试剂盒(Qiagen公司)和逆转录试剂盒(Qiagen公司)购自基因有限公司。HotStar-TaqTMDNA聚合酶(TaKaRa公司)购自百灵克公司, Mg^{2+} 及缓冲液为Taq酶自带。RNase inhibitor, Oligo-dT(Promega公司)和实时荧光定量PCR反应试剂盒(Bio-rad公司)购自东胜创新公司。其余常用试剂购自北京鼎国生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 参照相关的造模方法^[8-10]建立肥胖胰岛素抵抗和2型糖尿病小鼠模型并加以改进。现简述如下: 健康中国小鼠40只, 雌雄各半, 随机分为普食正常对照组和高脂饮食组, 前者10只, 饲以普通饲料; 后者30只, 饲以高脂饮食。饲养4 wk后, 高脂饮食喂养的小鼠自发形成肥胖性胰岛素抵抗, 将这些肥胖性胰岛素抵抗小鼠随机分成2组, 一组(20只)禁食12 h后, 按 40 mg/kg 的剂量间隔2 d 2次腹腔注射STZ(将STZ用 0.1 mmol/L , pH4.2的无菌柠檬酸缓冲液配制成1% STZ溶液, 0.2 mm 微孔过滤灭菌), 注射后继续禁食12 h建立2型糖尿病模型。另一组(10只)及普食正常对照组(10只)注射等量的 0.1 mmol/L , pH4.2的无菌柠檬酸缓冲液(注射方式和剂量同前)。处理后, 各组小鼠继续维持原饮食2 wk。2型糖尿病和胰岛素抵抗小鼠模型依据空腹血糖(糖尿病小鼠 $\geq 9 \text{ mmol/L}$)和口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT)确定。造模结束时共得到2型糖尿病小鼠15只。造模结束后, 小鼠分为3组: 正常对照组、胰岛素抵抗组和2型糖尿病组, 每组10只。实验结束时, 各组小鼠

禁食12 h, 乙醚麻醉, 眼内眦静脉取血并处死, 剖开腹腔, 迅速取出肝脏, 称质量, 大部分肝脏液氮速冻并保存于-80℃备用, 少部分肝脏固定于40 g/L中性甲醛溶液, 4℃ 3 000 g 20 min离心分离血浆并保存于-80℃备用。

1.2.2 OGTT和糖耐量试验曲线下面积: 地鼠禁食12 h后, 给予葡萄糖2 g/kg灌胃, 乙醚麻醉后, 在设定的时间点(0, 30, 60, 120和180 min)眼内眦静脉取血测血糖。糖耐量曲线下面积 = 1/2空腹测定值+60 min 测定值+120 min测定值+1/2 180 min测定值。

1.2.3 血生化检测: 血浆FFAs, TC, LDL, HDL和TG的浓度采用Randox公司试剂盒, 应用日立8060全自动生化分析仪进行检测。应用稳豪血糖仪检测血糖。应用Linco公司鼠胰岛素ELISA试剂盒检测血浆胰岛素浓度。

1.2.4 组织形态学观察: 肝组织固定于10%中性甲醛溶液, 逐级脱水, 石蜡包埋, 切片, HE染色, 光镜观察。

1.2.5 基因表达芯片检测: 应用Qiagen公司RNeasy试剂盒提取肝脏总RNA。纯化后, 用分光光度计定量, 甲醛变性凝胶电泳质检。5 μg总RNA用cDNA Synthesis Kit逆转录成cDNA, 经过纯化, 用T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System将双链cDNA进行体外转录合成cRNA, 然后, 取2 μg cRNA逆转录成cDNA, 2 μg cDNA用40 μmol/L Cy5-dCTP或Cy3-dCTP标记。36k Mouse Genome(Mouse Genome Version 4.0 of Operon Co.) 代表大约25 000个基因, 被点样阵列于75×25的玻片上。依据生产者提供的小鼠和地鼠基因组序列的高度保守性和交叉反应的高度可能性, 我们使用小鼠的基因芯片杂交地鼠的cDNA。0.9 μg标记的cDNA溶于30 μL杂交液(3×SSC, 0.2% SDS, 5×Denhart's和25%甲酰胺)中, 加样于基因芯片的玻片上于42℃杂交过夜, 杂交结束后, 先在42℃含0.2% SDS和2×SSC的溶液中洗5 min, 而后在0.2×SSC溶液中室温洗5 min。玻片甩干后即可用于扫描。每组随机选取3只地鼠用于基因芯片分析。基因芯片用LuxScan 10KA双通道激光扫描仪(CapitalBio公司)进行扫描。采用GenePix Pro 4.0图像分析软件(Axon Instruments公司)对芯片图像进行分析, 把图像信号转化为数字信号, 然后对芯片数据用Lowess方法进行归一化, 计算Ratio值, 最后以差异为1.5倍的标准来确定差异表达基因并对差异表达的基因进行GO(gene ontology)分析。

1.2.6 实时定量PCR检测: 使用Qiagen公司的RNeasy Mini Kit提取总RNA。分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 光吸收值, 计算总RNA浓度, 并用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定完整性。取1 μg总RNA应用cDNA合成试剂盒合成cDNA。每个基因的特异引物对序列应用软件设计或来自自己发表的文献。在实时定量PCR扩增之前对引物进行普通PCR扩增以得到最适反应条件。50 ng总RNA的逆转录产物使用iQ Syber Green Supermix和 iCycler iQ Real-Time PCR Detection System按iQ SYBR Green Mix Kit说明书扩增。反应条件是: 95℃ 3 min, 95℃ 10 s 59℃ 45 s 45个循环。扩增之后, 做溶解曲线, 反应从59℃开始, 每个循环10 s上升0.5℃共80个循环。每个反应均重复3次。设立阴性对照。扩增之前测定每对引物的扩增效率, 经检测所用引物的扩增效率均接近于1。样本目标基因相对含量的计算使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法^[11]。β-actin作为内参基因。引物序列见表1。

统计学处理 数据以mean±SD表示。统计学差异使用SPSS13.0进行t检验和单因素方差分析检验。 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠的代谢特征 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠的表型和代谢特征见表2。实验结束时, 与正常对照组相比, 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠的体质量显著增加($P<0.05$), 表现肥胖, 但两者的体质量无显著性差异($P>0.05$)。胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠的肝脏重量明显增加($P<0.05$), 肝质量/体质量的比值显著高于对照组($P<0.05$), 肝脏呈肿大状态。与正常对照组相比, 除了HDL水平降低以外, 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠的血脂(包括FFAs, TC, LDL和TG)水平显著升高($P<0.05$)。胰岛素抵抗地鼠的血糖虽然有所升高, 但尚未达到糖尿病的血糖标准, 而是处于正常与糖尿病间的过渡状态。与正常地鼠和胰岛素抵抗地鼠相比, 2型糖尿病地鼠的血糖显著升高($P<0.05$)。与正常对照组相比, 胰岛素抵抗地鼠表现明显的高胰岛素血症, 而2型糖尿病地鼠表现相对的高胰岛素血症。与对照组地鼠相比, 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠OGTT各指定点的血糖值增高($P<0.05$), 血浆胰岛素的水平异常, OGTT的糖曲线下面积增大($P<0.05$), 胰岛素曲线下面积增大($P<0.05$, 图1)。胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠的胰岛素敏感指数降低($P<0.05$),

■相关报道

近期研究显示肝内脂代谢产物的沉积激活了丝氨酸激酶级联反应, 导致降低胰岛素受体激酶活性和胰岛素信号通路代谢缺陷, 形成胰岛素抵抗。但诱导上述脂及脂代谢产物沉积的相关分子和信号通路及分子机制尚未完全阐明。

■创新盘点

本实验选择具有糖尿病易感性和脂代谢类人性的中国地鼠建立疾病模型,应用基因芯片技术,一种解码疾病相关复杂基因表达谱改变的有力工具,发现了新的有助于2型糖尿病脂肪肝相关胰岛素抵抗形成的基因表达改变模式和相关机制。

表 1 实时荧光定量PCR引物列表

引物名称	序列号	引物序列
SREBP-1a	NM_011480	5'-ATGGACGAGCTGGCCTTCGGTGAGGCGGC-3' 5'-CAGGAAGGCTTCCAGAGAGGA-3'
SREBP-1c	NM_011480	5'-GCTGTTGGCATCCTGCTATC-3' 5'-TAGCTGGAAGTGACGGTGGT-3'
SREBP-2	U12330	5'-AGCTGGCAAATCAGAAAAACAAG-3' 5'-GATTAAAGTCTTCAATCTTCAAGTCCAC-3'
LXR α	AJ132601	5'-TCAGCATCTTCTCTGCAGACCGG-3' 5'-TCATTAGCATCCGTGGGAACA-3'
LXR β	NM_009473	5'-AAGCAGGTGCCAGGGTTCT-3' 5'-TGCATTCTGTCTCGTGGTTGT-3'
PPAR α	NM_011144	5'-TGAGGAAGCCGTTCTGTGAC-3' 5'-GGTGTCTATCTGGATGGTTGC-3'
PPAR β/δ	NM_011145	5'-GCCTCGGGCTTCCACTAC-3' 5'-AGATCCGATCGCACTTCTCA-3'
PPAR γ	NM_011146	5'-CCCCTGCTCCAGGAGATCTAC-3' 5'-GCAATCAATAGAAGGAACACGTTGT-3'
HMG-CoA reductase	X00494	5'-AGATACTGGAGAGTGCCGAGAAA-3' 5'-TTTGTAGGCTGGGATGTGCTT-3'
HMG-CoA synthase	L00326	5'-CCTGGGTCACTTCCTTTGAATG-3' 5'-GATCTCAAGGGCAACGATTCC-3'
LDLR	NM_010700	5'-CCAACCTGAAGAATGTGGTG-3' 5'-CAGGTCCTCACTGATGATGG-3'
FAS	NM007988	5'-CACAGATGATGACAGGAGATGG-3' 5'-TCGGAGTGAGGCTGGGTTGAT-3'
SCD-1	NM009127	5'-TGGGTTGGCTGCTTGTG-3' 5'-GCGTGGGCAGGATGAAG-3'
ACC	AF356089	5'-ACACTGGCTGGCTGGACAG-3' 5'-CACACAACCTCCCAACATGGTG-3'
PEPCK	NM_011044	5'-GAGTTCCTGCCTCTCTCCAC-3' 5'-TTCCACGAACCTCCTCACTG-3'
G-6-pase	U00445	5'-CATCAATCTCCTCTGGGTGGC-3' 5'-TGTTGCTGTAGTAGTCGGTGTCC-3'
PGC-1 α	BC066868	5'-TCTGGAAGTGCAGGCCTAACTC-3' 5'-GCAAGAGGGCTTCAGCTTTG-3'
CYP7A1	NM_007824	5'-AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA-3' 5'-GTCCGGATATTCAAGGATGCA-3'
Gck	NM_010292	5'-AGAGCAGATCCTGGCAGAGT-3' 5'-TGGTTCCTCCCAGGTCTAAG-3'
Acox	NM_053115	5'-CCAGGACAGAGGTTCTTGTT-3' 5'-TCTCAGGAAGGACTTGGCTT-3'
Cpt1	NM_013495	5'-CTCAGTGGGAGCGACTTTCA-3' 5'-GGCCTCTGTGGTACACGACAA-3'
Acadm	NM_007382	5'-TGACGGAGCAGCCAATGA-3' 5'-ATGGCCGCCACATCAGA-3'
LPL	NM_008509	5'-GCCCAGCAACATTATCCAGT-3' 5'-GGTCAGACTTCCTGCTACGC-3'
FAT / CD36	NM_007643	5'-GCCAAGCTATTGCGACATGA-3' 5'-GATAGACCTGCAAATGTCAGAGGAA-3'
aP2	NM_024406	5'-AACACCGAGATTTCTTT-3' 5'-ACACATTCCACCACCAG-3'
β -actin	AY618569	5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3' 5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'

表 2 正常对照组、胰岛素抵抗组和2型糖尿病组地鼠的代谢表型特征 (mean \pm SD, $n = 10$)

	正常对照组	胰岛素抵抗组	2型糖尿病组
体质量(g)	123.6 \pm 9.9	144.3 \pm 8.7 ^a	143.4 \pm 8.3 ^a
肝质量(g)	3.57 \pm 0.66	5.55 \pm 0.95 ^a	6.10 \pm 0.62 ^a
肝质量/体质量(%)	2.7 \pm 0.3	3.7 \pm 0.4 ^a	4.1 \pm 0.1 ^{ac}
血糖(mmol/L)	4.33 \pm 0.61	6.56 \pm 0.90 ^a	11.00 \pm 1.22 ^{ac}
血胰岛素(μ g/L)	0.91 \pm 0.14	1.95 \pm 0.28 ^a	1.52 \pm 0.25 ^{ac}
TG(mmol/L)	1.91 \pm 0.33	7.38 \pm 0.81 ^a	7.83 \pm 0.75 ^a
FFAs(mmol/L)	1.23 \pm 0.31	6.27 \pm 0.96 ^a	6.41 \pm 0.89 ^a
LDL(mmol/L)	1.89 \pm 0.25	10.20 \pm 0.82 ^a	11.95 \pm 1.58 ^{ac}
HDL(mmol/L)	1.60 \pm 0.14	1.18 \pm 0.28 ^a	1.13 \pm 0.21 ^a
TC(mmol/L)	6.22 \pm 0.65	14.66 \pm 1.97 ^a	15.76 \pm 1.82 ^a
$G_0 \times I_0$	105.02 \pm 14.62	240.80 \pm 58.07 ^a	310.60 \pm 70.00 ^{ac}
IR _{HOMA}	4.48 \pm 0.54	10.70 \pm 2.58 ^a	14.40 \pm 3.10 ^{ac}
QUICKI	0.3061 \pm 0.007	0.2752 \pm 0.007 ^a	0.2621 \pm 0.006 ^a

QUICKI = $1/(\log I_0 + \log G_0)$, 其中 I_0 为空腹胰岛素, 其单位是mU/L, G_0 为空腹血糖, 其单位是mg/dL; $HOMA-IR$ 或 IR_{HOMA} = 空腹血糖(mmol/L) \times 空腹胰岛素(mU/L)/22.5; $G_0 \times I_0$ (G_0 为空腹血糖, 其单位是mmol/L, I_0 为空腹胰岛素, 其单位是mU/L).

^a $P < 0.05$ vs 对照组, ^c $P < 0.05$ vs 2型糖尿病组.

而胰岛素抵抗指数升高($P < 0.05$). 2型糖尿病地鼠的胰岛素抵抗程度显著高于胰岛素抵抗地鼠($P < 0.05$, 表2).

2.2 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏脂沉积组织形态学研究(图2)显示对照组地鼠肝组织结构和细胞形态正常. 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠均出现肝脏脂沉积(肝脂肪变性). 胰岛素抵抗地鼠的肝细胞内出现细小的和中等大小的脂滴并呈现轻中度的肝脏脂肪变性. 2型糖尿病地鼠的肝细胞内出现中等大小的脂滴并且含有中等大小脂滴的肝细胞数目稍增多, 但亦呈现轻中度的肝脏脂肪变性. 总体看来, 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏的脂沉积状况相近似, 并无本质差异.

2.3 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏基因表达改变 基因芯片分析显示在胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏中, 分别大约有7.2%(1 800)和12%(3 000)个基因至少上调或下调1.5倍. 在胰岛素抵抗地鼠肝脏中, 1 800个差异表达的基因中大约1 025(4.1%)个基因上调, 775(3.1%)个基因下调. 而在2型糖尿病地鼠肝脏中, 3 000个差异表达的基因中1 700(6.8%)个基因上调, 1 300(5.2%)个基因下调. 这些差异表达的基因主要与代谢、转录、信号转导、细胞通讯、转运、刺激反应、细胞生长和维持、应激、细胞周期、凋亡及调节、细胞增殖和分化、发育、细胞黏附、蛋白修饰、防御反应、

翻译和细胞结构等相关. G_0 分析结果显示在代谢相关差异表达的基因中, 胰岛素抵抗地鼠有199个基因, 2型糖尿病地鼠有247个基因与糖尿病相关. 这些基因主要与肝脏糖代谢、脂代谢、信号通路和转录因子/核因子相关. 在这199和247个差异表达的基因中有143个(包括67个上调和76个下调基因)基因共同表达于胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠, 其中部分被列于表3. 而在其余的差异表达的基因中, 24个基因只在胰岛素抵抗地鼠上调; 49个基因只在2型糖尿病地鼠上调, 32个基因只在胰岛素抵抗地鼠下调; 55个基因只在2型糖尿病地鼠下调.

2.4 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏中改变的关键调节者LXRs, SREBPs和PPARs及其靶基因的表达 表3显示与正常对照组相比, 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏中SREBPs基因的表达增加. SREBP-1c调节的脂肪酸合成相关靶基因, 如脂肪酸合成酶(FAS)、乙酰辅酶A羧化酶(ACC)和硬脂酰辅酶A去饱和酶-1(SCD-1)的表达升高; SREBP-2调节的胆固醇代谢相关靶基因, 如羟甲戊二酰辅酶A合成酶(HMG CoA synthase)、羟甲戊二酰辅酶A还原酶(HMG CoA reductase)和高密度脂蛋白受体(LDLR)的表达也增加; 由LXR α 调节的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PEPCK)、葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)和过氧化物酶体增殖体激活的受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)基因的表达升高; PPAR γ 及其靶基因脂蛋白

应用要点

研究肝脏胰岛素抵抗, 尤其是脂肪肝相关胰岛素抵抗形成的分子机制是了解肥胖相关2型糖尿病发生的前提. 同时为肥胖相关2型糖尿病及相关疾病的饮食和药物防治提供分子靶点.

■同行评价

本文内容新颖, 方法可靠, 对了解脂肪肝与糖尿病的关系有一定意义.

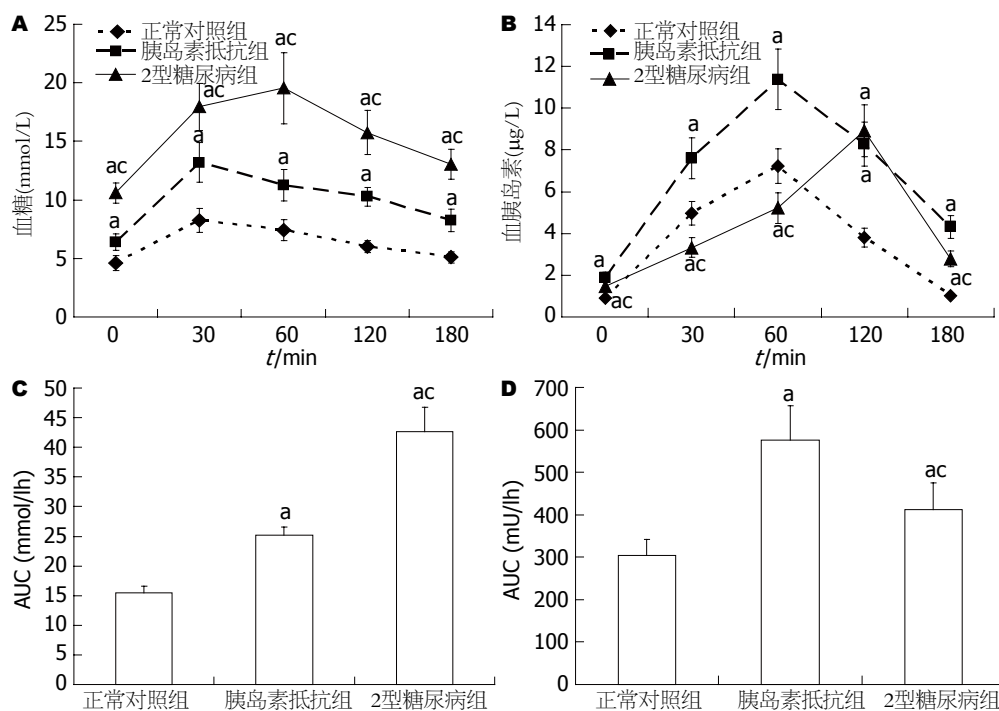


图1 OGTT检测正常对照组、胰岛素抵抗组和2型糖尿病组地鼠。A: 葡萄糖; B: 胰岛素; C: 葡萄糖曲线下面积; D: 胰岛素曲线下面积。* $P < 0.05$ vs 正常对照组; $^{\#}P < 0.05$ vs 2型糖尿病组。

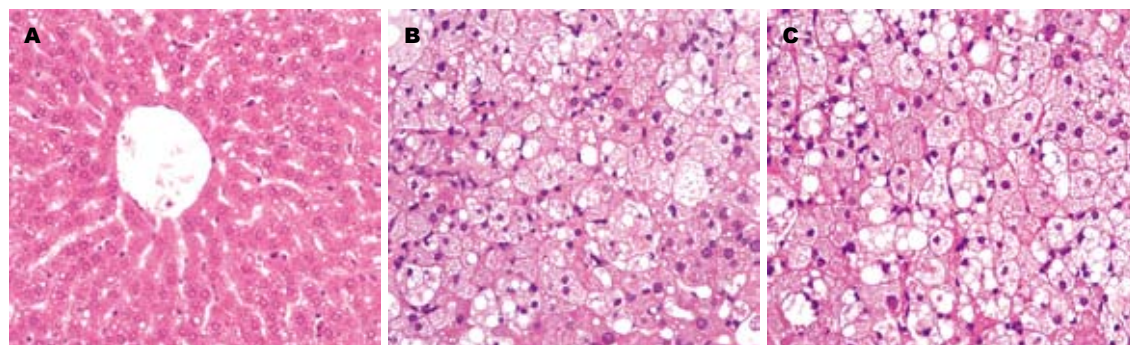


图2 正常对照组地鼠、胰岛素抵抗组地鼠和2型糖尿病组地鼠肝脏的组织形态学改变(H&E染色 $\times 200$)。A: 正常对照组; B: 胰岛素抵抗组; C: 2型糖尿病组。

脂酶(LPL)、脂肪酸转运者(FAT/CD36)和脂肪酸结合蛋白(ap2)的表达也升高。在2型糖尿病地鼠的肝脏中上述升高表达的基因高于其在胰岛素抵抗地鼠肝脏中的表达(表3)。与正常对照组相比较, 在胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏中LXR α 、PPAR α 和PPAR β/δ 基因表达降低, 而LXR β 基因表达未发生改变。PPAR α 调节的靶基因如酰基辅酶A氧化酶(Acox)、肉碱棕榈酰转移酶1(Cpt1)和中链酰基辅酶A脱氢酶(Acadm)的表达降低, 而由LXR α 调节的靶基因如胆固醇7 α 羟化酶1(CYP7A1)和葡萄糖激酶(Gck)的表达也降低。在2型糖尿病地鼠肝脏中上述降低的基因表达低于其在胰岛素抵抗地鼠肝脏中的表达(表3)。

2.5 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏LXRs, SREBPs和PPARs及其某些靶基因表达改变的实时定量RT-PCR验证 为了验证胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏中LXRs, SREBPs和PPARs及其靶基因表达的改变, 我们选择了包括LXRs, SREBPs和PPARs在内的25个基因来进一步应用实时定量RT-PCR来研究其表达状况并与基因芯片的结果相比较。上述被检基因的实时定量RT-PCR的结果与基因芯片的结果相似。与正常对照组相比, 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏中SREBPs(SREBP-1a, SREBP-1c和SREBP-2)和PPAR γ 的表达升高, LXR α , PPAR α 和PPAR β/δ 的表达降低, 而LXR β 的表达未发生改变。另外, PEPCK, G-6-Pase, PGC-1 α , FAS,

表 3 胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏中基因表达芯片显示的部分与糖脂代谢相关的差异表达基因

序列号	基因名称	胰岛素抵抗 组(倍数变化)	2型糖尿病 组(倍数变化)	调解者 ¹
NM_007988	fatty acid synthase (Fasn)	2.26	3.99	SREBP-1
BE865030	acetyl-Coenzyme A carboxylase (ACC)	2.04	3.33	SREBP-1
NM_009127	Stearoyl CoA desaturase 1(Scd1)	2.57	4.27	SREBP-1
NM_053115	acyl-Coenzyme A oxidase	-1.99	-2.66	PPAR α
NM_013495	carnitine palmitoyltransferase 1, liver (Cpt1)	-1.90	-2.60	PPAR α
NM_007382	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, medium chain (Acadm)	-2.09	-2.75	PPAR α
NM_007824	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp7a1)	-2.00	-3.02	LXR α
BM937289	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase(Hmgcr)	2.03	3.02	SREBP-2
NM_145942	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase (Hmgcs)	1.72	3.83	SREBP-2
NM_010700	low density lipoprotein receptor (Ldlr)	1.97	2.87	SREBP-2
NM_007643	CD36 antigen (Cd36) CD36/ FAT	2.02	3.31	PPAR γ
NM_010292	glucokinase (Gck)	-2.05	-2.99	LXR α
NM_008061	glucose-6-phosphatase, catalytic (G6pc)	1.89	2.37	LXR α
NM_011044	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1, cytosolic (Pck1)	1.90	3.61	LXR α
NM_011480	sterol regulatory element binding factor 1 (Srebf1)	2.76	3.72	LXR α
XM_127995	sterol regulatory element binding factor 2 (Srebf2)	2.65	3.38	
NM_013839	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3 (Nr1h3)	-2.07	-2.80	LXR α
NM_009473	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2 (Nr1h2)	NC	NC	
NM_011144	peroxisome proliferator activated receptor alpha (Ppara)	-2.13	-3.14	
NM_011145	peroxisome proliferator activator receptor delta (Ppard)	-2.03	-2.82	
NM_011146	peroxisome proliferator activated receptor gamma (Pparg)	2.18	2.91	
NM_008509	lipoprotein lipase (Lpl)	2.06	3.79	PPAR γ
NM_024406	fatty acid binding protein 4, adipocyte (Fabp4), aP2	2.17	3.87	PPAR γ
NM_008904	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 alpha (Ppargc1a)	2.20	3.21	LXR α

¹在后续研究中确定基因的主要调解者. NC表示无变化.

ACC, SCD1, LDLR, HMG CoA synthase, HMG CoA reductase, LPL, FAT/CD36和ap2的表达增加而CYP7A1, Gck, Acox, Cpt1和Acadm的表达降低. 同时, 在胰岛素抵抗地鼠肝脏和2型糖尿病地鼠肝脏中LXR α , SREBPs和PPARs及其靶基因表达改变存在统计学差异($P<0.05$, 图3).

3 讨论

糖尿病脂毒性学说提出异常的脂代谢可造成胰岛素敏感组织中异常的脂沉积并导致胰岛素敏感组织功能的异常(胰岛素抵抗), 即导致脂毒性. 造成肥胖的高脂饮食增加肝脏脂代谢产物的含量, 形成形态学上的肝脂肪变性, 同时在分子水平激活了包括蛋白激酶C ϵ 的丝氨酸激酶级联反应, 导致降低胰岛素受体、胰岛素受体底物1和2、磷酸肌醇激酶3和蛋白激酶B的激酶活性而诱发肝脏胰岛素抵抗^[12,13]. 尽管脂肪肝相关胰岛素抵抗的分子机制正被广泛研究, 但参与脂肪肝相关胰岛素抵抗的肝脏基因表达改变尚未完

全清楚. 我们的结果显示异常的LXRs, SREBPs和PPARs表达参与胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠脂肪肝相关胰岛素抵抗的形成.

LXRs包括LXR α 和LXR β 两个异构体, 是核受体家族成员, 被认为是炎症性细胞因子、胆固醇代谢、脂的生物合成、糖稳态和胆汁酸代谢的关键调解者^[14]. 本研究结果显示在胰岛素抵抗地鼠和2型糖尿病地鼠肝脏中LXR α , CYP7A1和Gck的表达降低而PEPCK, G6Pase和PGC-1 α 的表达增加. 这些基因表达改变提示降低表达的LXR α 不能有效的抑制肝脏糖异生基因PEPCK, G6Pase和PGC-1 α 的表达而抑制肝脏的糖异生, 因而有助于肝糖的产生和外输. 降低表达的LXR α 不能有效的诱导肝脏Gck基因的表达而增加肝脏对糖的利用. 因此, 降低表达的LXR α 有助于形成高血糖. 同时, 增加表达的肝脏PEPCK, G6Pase和PGC-1 α 有助于胰岛素抵抗、糖耐量异常和肥胖相关2型糖尿病的发生^[15-17]. 另外, 降低表达的LXR α 和增加表达的

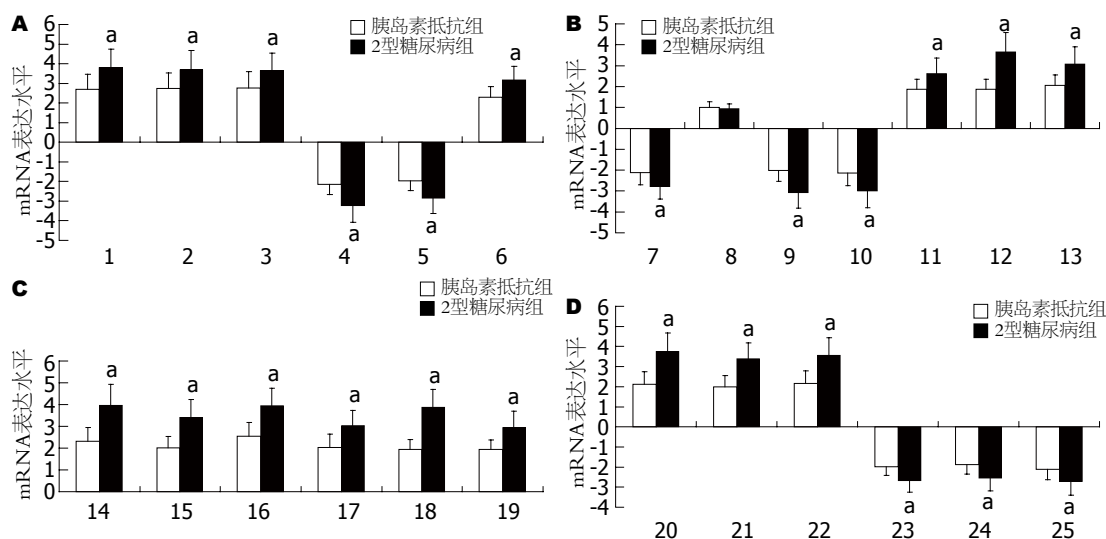


图3 胰岛素抵抗小鼠和2型糖尿病小鼠肝脏中LXRs, SREBPs 和PPARs及其靶基因相对表达的比较. A: 在胰岛素抵抗小鼠和2型糖尿病小鼠肝脏中SREBPs, LXRs和PPARs基因表达(mRNA)的相对含量的比较; B-D: 在胰岛素抵抗小鼠和2型糖尿病小鼠肝脏中FAS, ACC, SCD-1, HMG CoA reductase, HMG CoA synthase, LDLR, CYP7A1, PGC-1 α , Gck, G-6-Pase, PEPCK, Acox, Cpt1, Acadm, LPL, FAT/CD36和ap2基因表达(mRNA)的相对含量的比较. 1: SREBP-1 α ; 2: SREBP-1 β ; 3: SREBP-2; 4: PPAR α ; 5: PPAR β /8; 6: PPAR γ ; 7: LXR α ; 8: LXR β ; 9: CYP7A1; 10: Gck; 11: G-6-Pase; 12: PEPCK; 13: PGC-1 α ; 14: FAS; 15: ACC; 16: SCD-1; 17: HMG-CoA-reductase; 18: HMG-CoA-synthase; 19: LDLR; 20: LPL; 21: FAT/CD36; 22: ap2; 23: Acox; 24: Cpt1; 25: Acadm. ^aP<0.05 vs 胰岛素抵抗组.

SREBP-1c降低CYP7A1的表达^[18], 这将降低胆汁酸的合成而有助于肝脏胆固醇的沉积和脂肪肝相关胰岛素抵抗的形成. 在胰岛素抵抗小鼠和2型糖尿病小鼠的肝脏中LXR β 的表达未发生改变, 似乎不参与脂肪肝相关胰岛素抵抗的形成. 因此, 降低表达的肝脏LXR α 及其相应靶基因表达的改变有助于胰岛素抵抗小鼠和2型糖尿病小鼠异常的肝脏糖脂代谢、脂肪肝相关胰岛素抵抗的形成和肥胖相关2型糖尿病的发生.

SREBPs属于膜结合转录因子家族, 主要参与脂的合成代谢和胰岛素诱导的葡萄糖代谢. 哺乳动物细胞基因组编码3个SREBP异构体, 分别为SREBP-1a, SREBP-1c和SREBP-2. 本研究结果显示在胰岛素抵抗小鼠和2型糖尿病小鼠肝脏中SREBPs(SREBP-1a, SREBP-1c和SREBP-2), FAS, ACC, SCD1, LDLR, HMG CoA synthase和HMG CoA reductase的表达增加. 肝脏增加表达的SREBPs可能主要由高脂饮食^[15]或增高的血糖^[19]诱导形成. 这或许可解释为什么当肝脏LXR α 表达降低时SREBPs表达增加的原因. 增强表达的SREBP-1c将诱导脂合成基因, 如FAS, ACC和SCD1的表达, 增加肝脏TG的沉积^[20], 有助于脂肪肝相关胰岛素抵抗的形成. 另外, 增强表达的SREBP-1c也可以通过直接抑制胰岛素受体底物2基因转录而抑制胰岛素信号通路, 从而引起或加重胰岛素抵抗^[21]. 增强表达

的SREBP-2将诱导LDLR, HMG CoA synthase和HMG CoA reductase的表达而增加胆固醇的摄取和合成^[22]. 增强表达的SREBP-1a似乎可以同时参与脂和胆固醇的合成^[23]. 因此, 增强表达的SREBPs及其靶基因将导致肝脏脂代谢异常和脂沉积, 这将有助于胰岛素抵抗小鼠和2型糖尿病小鼠脂肪肝相关胰岛素抵抗的形成.

PPARs是配体激活的转录因子, 在脂肪酸的分解代谢中发挥重要作用. PPARs家族包括3个具有组织特异性表达的异构体(α 、 δ/β 、 γ)^[24]. 我们的结果显示胰岛素抵抗小鼠和2型糖尿病小鼠肝脏中PPAR α , PPAR β/δ , Acox, Cpt1和Acadm的表达降低而PPAR γ , LPL, FAT/CD36和ap2的表达增加. 这些基因表达改变提示降低表达的PPAR α 不能有效地诱导参与过氧化物酶体和线粒体脂肪酸氧化基因, 如Acox, Cpt1和Acadm的转录而有利于肝脂沉积. 有研究显示在2型糖尿病动物模型降低表达的PPAR α 及其与脂肪酸氧化相关的靶基因发生在脂沉积形成之前^[25-27]. 同时, 降低表达的PPAR α 诱导肝脏脂沉积和胰岛素抵抗^[28,29]. 因此, 降低表达的PPAR α 及其靶基因导致降低肝脏脂肪酸氧化, 有助于肝脏脂沉积而导致或恶化脂肪肝相关胰岛素抵抗. 降低表达的PPAR β/δ 不能有效地抑制SREBPs及成脂基因的表达, 而有助于肝脏脂沉积和胰岛素抵抗的形成^[30]. 增加表达的PPAR γ 及其靶基

因LPL, FAT/CD36和ap2, 有助于肝脏脂生成和沉积从而导致或恶化脂肪肝相关胰岛素抵抗^[31].

我们的结果显示肝脏LXR α , SREBPs和PPARs表达的改变与高脂饮食(高脂状态)和STZ处理(高糖状态)相关. 这些基因表达改变显示高脂饮食诱导的肥胖通过肝脏LXR α , SREBPs和PPARs表达的改变导致异常的肝脏糖脂代谢和脂沉积(肝脂肪变), 而有助于脂肪肝相关胰岛素抵抗的形成和2型糖尿病的发生.

志谢: 感谢寿克让和高红在技术方面的支持及帮助, 感谢本研究的所有参与者.

4 参考文献

- de Fourmestreaux V, Neubauer H, Poussin C, Farmer P, Falquet L, Burcelin R, Delorenzi M, Thorens B. Transcript profiling suggests that differential metabolic adaptation of mice to a high fat diet is associated with changes in liver to muscle lipid fluxes. *J Biol Chem* 2004; 279: 50743-50753
- Jeon JR, Kim JY. Effects of pine needle extract on differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and obesity in high-fat diet fed rats. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 2111-2115
- McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 7-18
- Unger RH, Orci L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24 Suppl 4: S28-S32
- Matsumoto M, Han S, Kitamura T, Accili D. Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2006; 116: 2464-2472
- Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 2000; 6: 77-86
- Wu Q, Ortegon AM, Tsang B, Doege H, Feingold KR, Stahl A. FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 3455-3467
- Luo J, Quan J, Tsai J, Hobler CK, Sullivan C, Hector R, Reaven GM. Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47: 663-668
- Danda RS, Habiba NM, Rincon-Choles H, Bhandari BK, Barnes JL, Abboud HE, Pergola PE. Kidney involvement in a nongenetic rat model of type 2 diabetes. *Kidney Int* 2005; 68: 2562-2571
- Mu J, Woods J, Zhou YP, Roy RS, Li Z, Zycband E, Feng Y, Zhu L, Li C, Howard AD, Moller DE, Thornberry NA, Zhang BB. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2006; 55: 1695-1704
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408
- Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 32345-3253
- 窠爱霞, 陆伦根. 胰岛素抵抗和非酒精性脂肪性肝病研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1197-1202
- Steffensen KR, Gustafsson JA. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1: S36-S42
- Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 615-622
- Sun Y, Liu S, Ferguson S, Wang L, Klepcyk P, Yun JS, Friedman JE. Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J Biol Chem* 2002; 277: 23301-23307
- Trinh KY, O'Doherty RM, Anderson P, Lange AJ, Newgard CB. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. *J Biol Chem* 1998; 273: 31615-31620
- Ponugoti B, Fang S, Kemper JK. Functional interaction of hepatic nuclear factor-4 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in CYP7A1 regulation is inhibited by a key lipogenic activator, sterol regulatory element-binding protein-1c. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2698-2712
- Hasty AH, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Perrey S, Yoshikawa T, Osuga J, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level. *J Biol Chem* 2000; 275: 31069-31077
- Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob)/Lep(ob) mice. *J Biol Chem* 2002; 277: 19353-19357
- Ide T, Shimano H, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Yamamoto T, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Fukamizu A, Yamada N. SREBPs suppress IRS-2-mediated insulin signalling in the liver. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 351-357
- Miserez AR, Muller PY, Barella L, Barella S, Staehelin HB, Leitersdorf E, Kark JD, Friedlander Y. Sterol-regulatory element-binding protein (SREBP)-2 contributes to polygenic hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2002; 164: 15-26
- Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 2002; 277: 9520-9528
- 于丹, 马红. 过氧化物酶增殖物激活受体 δ 研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2521-2525
- Ip E, Farrell G, Hall P, Robertson G, Leclercq I. Administration of the potent PPARalpha agonist, Wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004; 39: 1286-1296
- Yeon JE, Choi KM, Baik SH, Kim KO, Lim HJ, Park KH, Kim JY, Park JJ, Kim JS, Bak YT, Byun KS, Lee

- CH. Reduced expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α may have an important role in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 799-804
- 27 Wan YJ, Morimoto M, Thurman RG, Bojes HK, French SW. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gene is decreased in experimental alcoholic liver disease. *Life Sci* 1995; 56: 307-317
- 28 Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, De Minicis S, Nobili L, Salzano R, Omenetti A, Pacetti D, Sigmund S, Benedetti A, Casini A. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol* 2006; 169: 846-860
- 29 朱金玲, 张虎, 张淑红, 姚海涛, 张金波, 祝丽玲. 非酒精性脂肪肝大鼠L-FABP和PPAR- α mRNA的动态表达. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1525-1530
- 30 Qin X, Xie X, Fan Y, Tian J, Guan Y, Wang X, Zhu Y, Wang N. Peroxisome proliferator-activated receptor- δ induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* 2008; 48: 432-441
- 31 Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cao WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, Rao MS, Gonzalez FJ, Reddy JK. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. *J Biol Chem* 2003; 278: 498-505

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

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

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

内源性H₂S对大鼠实验性肝硬化门脉高压的影响

陈卫刚, 郑勇, 宋丽秀, 刘维国, 李文娟, 刘清华, 张宁, 齐翠花

陈卫刚, 郑勇, 宋丽秀, 刘维国, 李文娟, 刘清华, 张宁, 齐翠花, 石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832000

陈卫刚, 硕士生导师, 副教授, 主要从事肝硬化门脉高压方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30850004

作者贡献分布: 本课题由陈卫刚与郑勇设计; 实验过程由宋丽秀、刘维国及李文娟完成; 数据分析由宋丽秀、刘维国、李文娟、刘清华、张宁及齐翠花共同完成; 实验试剂由陈卫刚与郑勇提供; 文章撰写由陈卫刚与宋丽秀共同完成。

通讯作者: 郑勇, 教授, 博士生导师, 832000, 新疆维吾尔自治区石河子市, 河子大学医学院第一附属医院消化内科. zy2850@126.com
收稿日期: 2010-10-20 修回日期: 2010-12-10
接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-02-18

Endogenous hydrogen sulfide attenuates portal hypertension in rats with experimental hepatic cirrhosis

Wei-Gang Chen, Yong Zheng, Li-Xiu Song, Wei-Guo Liu, Wen-Juan Li, Qing-Hua Liu, Ning Zhang, Cui-Hua Qi

Wei-Gang Chen, Yong Zheng, Li-Xiu Song, Wei-Guo Liu, Wen-Juan Li, Qing-Hua Liu, Ning Zhang, Cui-Hua Qi, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30850004

Correspondence to: Associate Professor Yong Zheng, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zy2850@126.com

Received: 2010-10-20 Revised: 2010-12-10

Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of endogenous hydrogen sulfide (H₂S) on portal vein pressure in rats with experimental hepatic cirrhosis-induced portal hypertension and to explore mechanisms involved.

METHODS: Forty Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into control group, cirrhosis group, sodium hydrogen sulfide (NaHS) group, L-arginine methyl ester (L-NAME) plus zinc protoporphyrin (ZnPP) group, and NaHS plus L-NAME plus ZnPP group. After treatment, portal vein pressure and the levels of H₂S, NO, and CO in portal vein blood were

measured, and the expression of cystathionine-γ-lyase (CSE), nitric oxide synthase (NOS), and heme oxygenase (HO-1) in liver tissue was determined by Western blot.

RESULTS: Compared with the control group, portal pressure was significantly elevated (all $P < 0.05$) and the levels of plasma H₂S, NO, CO and hepatic CSE, iNOS, and HO-1 showed statistically significant differences in the other groups (H₂S: 134.49 μmol/L ± 12.25 μmol/L, 151.19 μmol/L ± 8.75 μmol/L, 160.82 μmol/L ± 6.79 μmol/L, 170.58 μmol/L ± 4.38 μmol/L vs 180.33 μmol/L ± 11.71 μmol/L; NO: 160.12 μmol/L ± 4.18 μmol/L, 129.25 μmol/L ± 3.09 μmol/L, 100.24 μmol/L ± 3.80 μmol/L, 90.23 μmol/L ± 2.87 μmol/L vs 81.11 μmol/L ± 2.91 μmol/L; CO: 111.12 μmol/L ± 2.25 μmol/L, 100.43 μmol/L ± 1.42 μmol/L, 83.72 μmol/L ± 1.78 μmol/L, 77.58 μmol/L ± 8.17 μmol/L vs 70.51 μmol/L ± 3.09 μmol/L; CSE: 121.72 ± 1.61, 150.26 ± 1.04, 142.79 ± 1.13, 157.28 ± 0.90 vs 159.30 ± 1.37; HO-1: 155.79 ± 1.29, 149.89 ± 1.63, 139.88 ± 1.73, 135.49 ± 1.21 vs 125.44 ± 0.93; iNOS: 165.69 ± 1.17, 160.68 ± 1.28, 150.66 ± 1.42, 145.55 ± 1.04 vs 135.22 ± 0.54, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Endogenous H₂S/CSE can regulate portal hypertension in rats with experimental hepatic cirrhosis perhaps via mechanisms associated with the changes in the NO/NOS and CO/HO-1 pathways.

Key Words: Hepatic cirrhosis; Portal hypertension; Hydrogen sulfide; Portal vein pressure; Nitric oxide synthase; Heme oxygenase

Chen WG, Zheng Y, Song LX, Liu WG, Li WJ, Liu QH, Zhang N, Qi CH. Endogenous hydrogen sulfide attenuates portal hypertension in rats with experimental hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 467-471

摘要

目的: 研究新型气体信号分子硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)对大鼠肝硬化门脉高压的影响及其调节机制。

方法: 对照组(8只), 肝硬化(Cirrhosis, C)

■背景资料

NO、CO和H₂S是近年新发现的一种气体信号分子, 在体内发挥着生物学作用, 三者参与门静脉高压的发病过程已被证实, 但具体机制尚不明确。

■同行评议者

施晓雷, 副主任医师, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科

■相关报道

国内近期研究发现H₂S参与了门静脉高压的形成与发展,外源性给予NaHS可以加重门静脉高压,其作用机制可能与H₂S影响了NO/NOS2体系变化有关。

组(8只), C+NaHS(C+S)组(8只), C+左旋硝基精氨酸甲酯(*L*-NAME)+锌原卟啉(ZnPP)(C+L+Zn)组(8只), C+NaHS+*L*-NAME+ZnPP(C+S+L+Zn)组(8只)。插管法测定各组大鼠门静脉压力(PVP), 同时测定血浆中H₂S、NO、CO含量; Western blot技术检测各组大鼠肝组织中CSE、iNOS、HO-1蛋白表达情况。

结果: 与对照组相比, 其他各组大鼠PVP显著升高(均 $P<0.05$), 血浆中H₂S、NO、CO含量及CSE、iNOS、HO-1蛋白表达差别均有统计学意义(H₂S: 134.49 $\mu\text{mol/L} \pm 12.25 \mu\text{mol/L}$, 151.19 $\mu\text{mol/L} \pm 8.75 \mu\text{mol/L}$, 160.82 $\mu\text{mol/L} \pm 6.79 \mu\text{mol/L}$, 170.58 $\mu\text{mol/L} \pm 4.38 \mu\text{mol/L}$ vs 180.33 $\mu\text{mol/L} \pm 11.71 \mu\text{mol/L}$; NO: 160.12 $\mu\text{mol/L} \pm 4.18 \mu\text{mol/L}$, 129.25 $\mu\text{mol/L} \pm 3.09 \mu\text{mol/L}$, 100.24 $\mu\text{mol/L} \pm 3.80 \mu\text{mol/L}$, 90.23 $\mu\text{mol/L} \pm 2.87 \mu\text{mol/L}$ vs 81.11 $\mu\text{mol/L} \pm 2.91 \mu\text{mol/L}$; CO: 111.12 $\mu\text{mol/L} \pm 2.25 \mu\text{mol/L}$, 100.43 $\mu\text{mol/L} \pm 1.42 \mu\text{mol/L}$, 83.72 $\mu\text{mol/L} \pm 1.78 \mu\text{mol/L}$, 77.58 $\mu\text{mol/L} \pm 8.17 \mu\text{mol/L}$ vs 70.51 $\mu\text{mol/L} \pm 3.09 \mu\text{mol/L}$; CSE: 121.72 ± 1.61 , 150.26 ± 1.04 , 142.79 ± 1.13 , 157.28 ± 0.90 vs 159.30 ± 1.37 ; HO-1: 155.79 ± 1.29 , 149.89 ± 1.63 , 139.88 ± 1.73 , 135.49 ± 1.21 vs 125.44 ± 0.93 ; iNOS: 165.69 ± 1.17 , 160.68 ± 1.28 , 150.66 ± 1.42 , 145.55 ± 1.04 vs 135.22 ± 0.54 , 均 $P<0.05$).

结论: 内源性H₂S/CSE体系在缓解肝硬化门脉高压中发挥着重要的调节作用, 其机制可能与NO/NOS、CO/HO-1体系的改变有关。

关键词: 肝硬化; 门静脉高压; 硫化氢; 门静脉压力; 一氧化碳合酶; 一氧化氮合酶

陈卫刚, 郑勇, 宋丽秀, 刘维国, 李文娟, 刘清华, 张宁, 齐翠花. 内源性H₂S对大鼠实验性肝硬化门脉高压的影响. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 467-471

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/467.asp>

0 引言

门脉高压症是肝硬化失代偿期出现的一种严重的并发症。其严重程度直接影响着患者的生命。因此, 对其发病机制的探讨具有重要意义。肝硬化发生时, 肝组织结构、肝脏血管床改建是门静脉高压形成的病理基础; 而维持和加重门静脉高压的主要原因是内脏高动力循环状态, 其发病机制目前尚不清楚。以往研究发现, NO和CO可以引起内脏血管扩张而使门静脉系统血流量增加。H₂S是近年新发现的一种气体信号分子,

在体内发挥着与NO、CO相似而又不同的生物学作用^[1,2]。H₂S/CSE体系参与门静脉高压的发病过程已被证实^[3]。本课题组前期研究也发现H₂S体系在肝硬化发生发展中起着保持血管舒张状态的重要作用^[4], 研究还发现, 当肝硬化大鼠模型接受外源性H₂S供体-NaHS后, 门静脉高压状态得到缓解。那么, 内源性H₂S对肝硬化门脉高压到底发挥着什么作用? 作用过程中是否有其他气体信号分子参与? 目前尚不清楚。

本研究将NO合酶抑制剂-左旋硝基精氨酸甲酯(*L*-nitro arginine methyl ester, *L*-NAME)和CO合酶抑制剂-锌原卟啉(zinc protoporphyrin, ZnPP)同时应用于肝硬化门脉高压大鼠模型, 在阻断内源性NO、CO表达的基础上, 改变体内H₂S的浓度, 观察其对门静脉压力的影响, 进一步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 硫氢化钠、炔丙基甘氨酸、锌原卟啉购于Sigma公司; iNOS、HO-1、CSE多克隆抗体购自Santa Cruz公司; NO测定试剂盒购自南京建成生物工程研究院; NaHS、左旋硝基精氨酸甲酯、锌原卟啉均购自Sigma公司。其他试剂均为市售化学纯。上海雷磁厂PXS-270离子计及敏感硫电极(Pag/S1)、T1800紫外分光光度计、美国BIOPAC公司MP150型多导生理仪、凝胶图像系统(BIO-RAD Gel 2000)等。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: ♀SD大鼠40只(购于新疆医科大学实验动物中心, SPF级), 体质量在200 g左右, 随机分为5组: (1)正常对照组($n=8$); (2)肝硬化(cirrhosis C)组($n=8$); (3)肝硬化+NaHS(C+S)组($n=8$); (4)肝硬化+*L*-NAME+锌原卟啉(ZnPP)(C+L+Zn)组($n=8$); (5)肝硬化+NaHS+*L*-NAME+ZnPP(C+S+L+Zn)组($n=8$)。除对照组以外, 其余各组采用CCl₄复合因素法复制肝硬化大鼠模型。造模结束后, C+S组给予NaHS: 56 $\mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 腹腔注射, C+L+Zn组给予*L*-NAME: 5 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 腔注射及ZnPP: 20 $\mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 颈部皮下注射^[5]; C+S+L+Zn组给予NaHS: 56 $\mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 和*L*-NAME: 5 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 腹腔注射^[6], ZnPP: 20 $\mu\text{mol}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 颈部皮下注射。肝硬化组和对对照组腹腔注射等量的生理盐水并常规喂养。干预1 wk后经门静脉穿刺测量门静脉压力, 留取门静脉血浆及肝组织标本并处死大鼠。

1.2.2 门静脉压力测量: 用10%的水合氯醛腹腔麻醉大鼠(0.35 mL/100 g), 门静脉插管法测定门

静脉压力(本课题组改良此方法, 利用头皮针法穿刺测定). 门静脉压力>12 mmHg为肝硬化门脉高压形成.

1.2.3 门静脉血浆H₂S含量测定: 用敏感硫电极法^[7]测定门静脉血浆中H₂S含量.

1.2.4 门静脉血浆NO含量测定: 应用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒(硝酸还原酶法), 按说明严格操作, 复管, 在DU-721型紫外分光光度计上读取A值. 应用公式计算结果: NO($\mu\text{mol/L}$) = (样品管吸光度-空白管吸光度) × 标准品浓度 × 样品测试前稀释倍数 / (标准管吸光度-空白管吸光度).

1.2.5 门静脉血浆CO含量测定: 采用Chalmers^[8]的方法, 取0.2 mL血浆加入1 mL新鲜的血红蛋白溶液, 然后在加入200 mg连二亚硫酸钠, 振荡混匀后静置10 min, 在DU-721型紫外分光光度计上分别测定在541 nm和555 nm处的A值, 计算其比值(R). 然后根据标准曲线得出一氧化碳血红蛋白(HbCO)的百分比. 然后应用Chalmers公式计算血浆CO含量. 其公式为: CO($\mu\text{mol/L}$) = HbCO(%) × Hb(mg/L) × 4 000 / (100 × 0.2 × 64 456).

1.2.6 肝组织iNOS蛋白含量测定: 用Western blot检测各组大鼠肝组织中iNOS蛋白含量. 取各组大鼠相同部位肝组织, 根据组织大小加入约5倍体积蛋白裂解缓冲液在冰上将组织研磨成匀浆, 经4 °C 12 000 r/min离心10 min后, 取上清液用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度. 以30 μg /孔上样, 在10%十二烷基酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中进行电泳分离, 半干转膜法将蛋白质从SDS-PAGE凝胶中转移至PVDF膜, 在含5%脱脂奶粉的TBST液中封闭1 h, 加入一抗(兔抗大鼠iNOS抗体, 1:500稀释, Santa Cruz)、二抗(辣根标记山羊抗兔IgG, 1:10 000稀释, 北京中杉金桥), TBST漂洗后ECL化学发光, X线胶片曝光. 用GEL DOC-2000凝胶成像系统对曝光后条带的灰度值进行分析. 用 β -actin校正加样量.

1.2.7 肝组织HO-1蛋白含量测定: 用Western blot检测各组大鼠肝组织中HO-1蛋白含量, 具体步骤同上, 一抗(山羊抗大鼠HO-1抗体, 1:500稀释, Santa Cruz)、二抗(辣根标记兔抗山羊IgG, 1:10 000稀释, 北京中杉金桥).

1.2.8 肝组织CSE蛋白含量测定: 用Western blot检测各组大鼠肝组织中CSE蛋白含量, 具体步骤同上, 一抗(兔抗大鼠CSE抗体, 1:500稀释, Santa Cruz)、二抗(辣根标记山羊抗兔IgG, 1:10 000稀释, 北京中杉金桥).

统计学处理 数据均以mean ± SD表示, 应用

表 1 各组大鼠门静脉压力及血浆H₂S含量 (mean ± SD, $n = 8$)

分组	门静脉压力(mmHg)	H ₂ S含量($\mu\text{mol/L}$)
对照组	9.84 ± 1.09	180.33 ± 11.71
肝硬化(C)组	16.08 ± 1.16 ^a	134.49 ± 12.25 ^a
C+S组	13.95 ± 1.31 ^{ac}	151.19 ± 8.75 ^{ac}
C+L+Zn组	14.13 ± 0.56 ^{ace}	160.82 ± 6.79 ^{ace}
C+S+L+Zn组	12.34 ± 2.21 ^{aceg}	170.58 ± 4.38 ^{cg}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs C组; ^e $P < 0.05$ vs C+S组;

^g $P < 0.05$ vs C+L+Zn组.

SPSS16.0统计软件进行方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA); 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准.

2 结果

2.1 门静脉压力变化 与对照组相比, 各模型组PVP均升高($P < 0.05$), 以肝硬化组压力最高; 与肝硬化组相比, C+S组、C+L+Zn组、C+S+L+Zn组压力分别降低13.25%、12.13%、23.26%($P < 0.05$); 与C+S组或C+L+Zn组相比, C+S+L+Zn组压力进一步降低($P < 0.05$); C+S组和C+L+Zn组之间差异无统计学意义(表1).

2.2 门静脉血浆H₂S含量变化 与对照组相比, C组、C+S组、C+L+Zn组H₂S含量均降低($P < 0.05$); C+S+L+Zn组与对照组之间差异无统计学意义; 与肝硬化组相比, C+S组、C+L+Zn组、C+S+L+Zn组H₂S含量均升高($P < 0.05$); 与C+S组相比, C+S+L+Zn组H₂S含量进一步升高($P < 0.05$); C+S组和C+L+Zn组、C+L+Zn组和C+S+L+Zn组比较差异无统计学意义(表1).

2.3 门静脉血浆NO含量变化 与对照组相比, 各模型组NO含量均升高($P < 0.05$), 以肝硬化组含量最高; C+S组较肝硬化组降低($P < 0.05$); C+L+Zn组较C+S组降低($P < 0.05$); C+S+L+Zn组较C+L+Zn组进一步降低($P < 0.05$, 表2).

2.4 门静脉血浆CO含量 与对照组相比, 各模型组CO含量均升高($P < 0.05$), 以肝硬化组含量最高; C+S组较肝硬化组降低($P < 0.05$); C+L+Zn组较C+S组降低($P < 0.05$); C+S+L+Zn组较C+L+Zn组进一步降低($P < 0.05$, 表2).

2.5 肝组织中CSE蛋白含量变化 与对照组相比, 各模型组CSE蛋白含量均降低($P < 0.05$); 以肝硬化组含量最低; 与肝硬化组相比, C+S组、C+L+Zn组和C+S+L+Zn组CSE含量均升高($P < 0.05$); 与C+S组相比, C+L+Zn组CSE含量降低($P < 0.05$), C+S+L+Zn组CSE含量升高($P < 0.05$,

■创新盘点

外源性给予NO、CO抑制剂后, 改变硫化氢含量观察门静脉压力变化及NO、CO含量变化, 目前在肝硬化门静脉高压研究中相关报道甚少.

■应用要点

内源性H₂S/CSE体系在缓解肝硬化门脉高压中发挥着重要的调节作用,其机制可能与NO/NOS、CO/HO-1体系的改变有关。

表 2 各组大鼠门静脉血浆NO及CO含量 (mean ± SD, n = 8)

分组	NO含量(μmol/L)	CO含量(μmol/L)
对照组	81.11 ± 2.91	70.51 ± 3.09
肝硬化(C)组	160.12 ± 4.18 ^a	111.12 ± 2.25 ^a
C+S组	129.25 ± 3.09 ^{ac}	100.43 ± 1.42 ^{ac}
C+L+Zn组	100.24 ± 3.80 ^{ace}	83.72 ± 1.78 ^{ace}
C+S+L+Zn组	90.23 ± 2.87 ^{aceg}	77.58 ± 8.17 ^{abeg}

^aP<0.05 vs 对照组; ^cP<0.05 vs C组; ^eP<0.05 vs C+S组;

^gP<0.05 vs C+L+Zn组。

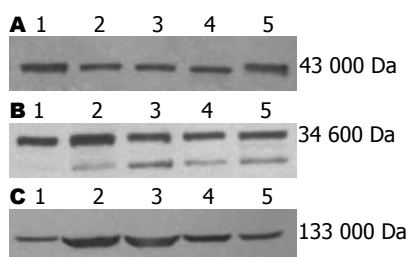


图 1 各组大鼠肝组织CSE, HO-1, iNOS蛋白表达变化. A: CSE; B: HO-1; C: iNOS. 1: 对照组; 2: C组; 3: C+S组; 4: C+L+Zn组; 5: C+S+L+Zn组. 任两组之间相比差异显著 ($P<0.05$).

图1, 表3).

2.6 肝组织中HO-1蛋白含量变化 与对照组相比, 各模型组HO-1蛋白含量均升高($P<0.05$); 以肝硬化组含量最高; C+S组较肝硬化组降低($P<0.05$); C+L+Zn组较C+S组降低($P<0.05$); C+S+L+Zn组较C+L+Zn组进一步降低($P<0.05$, 图1, 表3).

2.7 肝组织中iNOS蛋白含量变化 与对照组相比, 各模型组iNOS蛋白含量均升高($P<0.05$); 以肝硬化组含量最高; C+S组较肝硬化组降低($P<0.05$); C+L+Zn组较C+S组降低($P<0.05$); C+S+L+Zn组较C+L+Zn组进一步降低($P<0.05$, 图1, 表3).

3 讨论

肝硬化门脉高压症主要是由于肝硬变时门静脉系统血流机械性受阻和血管活性物质代谢紊乱引起内脏高动力循环所导致. 而有关内脏高动力循环的发病机制至今尚未完全清楚. 内源性气体信号分子NO和CO的发现使得门静脉高压的发病机制研究进入了一个全新的领域. 国内外研究显示: NO和CO是近年发现的两种具有扩血管作用的气体信使分子, 对肝脏的血液循环有着重要的调节作用. 本课题组前期研究也证实内源性NOS-NO系统、HO-CO系统在肝脏的血液动力学及门静脉高压的发生、发展中起重要作用^[9-11]. 有研究提出H₂S是继NO和CO之后发现

的心血管功能调节的新型气体信号分子^[12], 具有扩张血管^[13-15]、抑制平滑肌细胞增殖和诱导平滑肌细胞凋亡的作用^[16]. 在哺乳动物体内, H₂S通过5'磷酸吡哆醛依赖酶包括胱硫醚-β-合成酶(cystathionine-β-synthase, CBS)和胱硫醚-γ-裂解酶(cystathionine-γ-splitting enzyme, CSE)催化半胱氨酸分解代谢而产生^[17], 前者主要存在于神经系统, 而后者在主动脉、肺动脉、肠系膜动脉、尾动脉和门静脉有表达, 在肝脏中也有表达. 研究发现, H₂S在高血压、低氧性肺动脉高压发病中发挥调节作用. 国内近期研究发现H₂S参与了门静脉高压的形成与发展, 外源性给予NaSH可以加重门静脉高压, 其作用机制可能与H₂S影响了NO/NOS2体系变化有关^[3]. 本课题组前期研究发现: 随肝硬化病情进展, 下腔静脉血及门静脉血H₂S的表达逐渐下降^[4], 进一步研究发现外源性给予H₂S供体-NaHS后, H₂S/CSE体系上调, 门静脉压力降低. 表明内源性H₂S/CSE在肝硬化门脉高压中确实发挥重要的调节作用? 但其机制目前尚不清楚.

本实验中发现在大鼠肝硬化模型中PVP升高, 同时NO/NOS、CO/HO-1体系上调, 而H₂S/CSE下调, 与本课题组前期研究结果一致; 当外源性给予H₂S供体-NaHS后, 体内CSE蛋白表达及H₂S含量增高, PVP降低, NO/NOS、CO/HO-1体系均不同程度的下调, 表明H₂S可能具有改善肝硬化门脉高压的作用, 其机制可能是内源性H₂S/CSE体系通过影响NO/NOS、CO/HO-1体系的变化或直接舒张门脉系统血管而发挥作用. 为了更深入地研究H₂S在肝硬化门脉高压中的作用机制, 本实验中同时采用NOS抑制剂L-NAME和HO-1抑制剂ZnPP, 以阻断肝硬化大鼠模型中内源性NO、CO表达, 尽量排除NOS-NO、HO-CO系统的干扰, 在此基础上增加H₂S含量, 观察PVP变化. 实验发现: C+L+Zn组较肝硬化组门静脉血浆NO、CO含量降低, 肝组织NOS、HO-1蛋白表达减少, 表明干预成功, 而CSE蛋白表达增高, H₂S含量升高, 同时门静脉压力降低, 表明内源性NO、CO被抑制, 机体内H₂S/CSE体系和PVP同时都受到影响, PVP降低的原因可能是由于NO/NOS、CO/HO-1体系被抑制后直接降低机体内NO、CO水平或反馈性升高H₂S含量所导致的; 进一步研究发现, 在C+L+Zn组基础上给予H₂S供体后, 机体内H₂S及CSE蛋白含量较前升高, 门静脉血浆NO、CO含量、肝组织NOS、HO-1蛋白表达较前减少, 而PVP进一步降低, 结果再次表明内源性H₂S/CSE

表 3 各组大鼠CSE蛋白、iNOS蛋白和HO-1蛋白表达 (mean ± SD, n = 8)

分组	CSE	HO-1	iNOS
对照组	159.30 ± 1.37	125.44 ± 0.93	135.22 ± 0.54
C组	121.72 ± 1.61 ^a	155.79 ± 1.29 ^a	165.69 ± 1.17 ^a
C+S组	150.26 ± 1.04 ^{ac}	149.89 ± 1.63 ^{ac}	160.68 ± 1.28 ^{ac}
C+L+Zn组	142.79 ± 1.13 ^{ace}	139.88 ± 1.73 ^{ace}	150.66 ± 1.42 ^{ace}
C+S+L+Zn组	157.28 ± 0.90 ^{aceg}	135.49 ± 1.21 ^{aceg}	145.55 ± 1.04 ^{aceg}

^aP<0.05 vs 对照组; ^cP<0.05 vs C组; ^aP<0.05 vs C+S组; ^gP<0.05 vs C+L+Zn组。

对肝硬化门脉高压及内源性NO/NOS、CO/HO-1体系变化具有重要的调节作用。

国内有学者对H₂S在自发性高血压大鼠主动脉结构重建作用进行研究, 结果显示: H₂S不仅具有显著的扩血管效应, 还能抑制体外培养的主动脉平滑肌细胞增殖, CSE-H₂S体系下调是自发性高血压血管结构重建的重要原因之一^[18]。国外研究显示: 生理状态下H₂S通过ATP敏感的K⁺通道途径作用于血管平滑肌; 在心血管系统中, H₂S可能通过抑制丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)的活性来抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增殖, 从分子水平上直接调节VSMC的张力^[15]。有学者证实实验性肝硬化时可见门静脉管壁增厚, 平滑肌细胞的数目及收缩力增加。那么, 内源性H₂S是否具有通过调节肝硬化门静脉血管结构重建而影响肝硬化门脉高压的作用呢? 需进一步研究证实。

总之, 本研究结果提示: (1)内源性H₂S/CSE体系和NO/NOS、CO/HO-1体系三者之间可能存在相互影响; (2)内源性H₂S/CSE体系对肝硬化门脉高压的调节作用可能与NO/NOS、CO/HO-1体系的改变有关。

4 参考文献

- Chunyu Z, Junbao D, Dingfang B, Hui Y, Xiuying T, Chaoshu T. The regulatory effect of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302: 810-816
- Qi J, Du J, Wang L, Zhao B, Tang C. Alleviation of hypoxic pulmonary vascular structural remodeling by L-arginine. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 933-936
- 何春萍, 田德安, 王波, 刘梅, 但自力, 罗敏, 梅凡, 徐湖波, 梁扩寰. 硫化氢供体对实验性门静脉高压及内源性一氧化氮/一氧化氮合酶体系的影响. *胃肠病学和肝病杂志* 2007; 16: 572-575
- 张宁, 郑勇, 王于理, 李睿, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 赵

- 瑾, 李洪安. 内源性硫化氢在不同时期大鼠肝硬化中的作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 307-311
- Fernandez M, Bonkovsky HL. Increased heme oxygenase-1 gene expression in liver cells and splanchnic organs from portal hypertensive rats. *Hepatology* 1999; 29: 1672-1679
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 746-752
- 耿彬, 杜军保, 唐朝枢. 敏感硫电极法在测定心血管组织细胞及血浆胱硫醚-γ-裂解酶/硫化氢的应用. *北京大学学报(医学版)* 2005; 5: 545
- Chalmers AH. Simple, sensitive measurement of carbon monoxide in plasma. *Clin Chem* 1991; 37: 1442-1445
- 郑勇, 李睿, 孙侃, 常向云, 周婷, 王吉耀. 肝硬化患者一氧化氮、一氧化碳浓度与门静脉压力的关系. *中华消化杂志* 2006; 26: 424-425
- 郑勇, 孙侃, 周婷, 陈卫刚, 常向云, 陈辉, 王吉耀. HO-1、HO-1mRNA在肝硬化病人肝组织中的表达及与门静脉压力的关系. *复旦学报(医学版)* 2004; 31: 481-483
- 周婷, 郑勇, 孙侃, 杨军, 王吉耀. 诱导型一氧化氮合酶-一氧化氮系统在肝硬化大鼠不同时期的表达研究. *上海医学* 2004; 27: 271-272
- 杜军保, 陈晓波, 耿彬, 蒋宏峰, 唐朝枢. 硫化氢作为心血管信号分子的研究. *北京大学学报(医学版)* 2002; 34: 187
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 527-531
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 2001; 20: 6008-6016
- Du J, Hui Y, Cheung Y, Bin G, Jiang H, Chen X, Tang C. The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells. *Heart Vessels* 2004; 19: 75-80
- 陈晓波, 杜军保, 张春雨, 唐朝枢, 周伟仪. 新型气体信号分子硫化氢对低氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡的影响. *北京大学学报(医学版)* 2004; 36: 341-344
- Griffith OW. Mammalian sulfur amino acid metabolism: an overview. *Methods Enzymol* 1987; 143: 366-376
- Yan H, Du J, Tang C. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 22-27

编辑 李薇 电编 李薇

同行评价

本文学术性较好, 对进一步探讨门静脉高压的机制有一定作用。

实时超声造影技术对VX2兔肝癌影像学模型的诊断价值

周悦, 高剑波, 郭华, 万娅敏, 张瑞芳, 潘元威

■背景资料

随着声学技术的不断发展, 实时超声造影(CEUS)技术逐渐兴起。其主要借助于静脉注射造影剂和超声造影谐波成像技术, 显示微细血管和组织血流灌注情况, 目前已能有效地增强心肌、肝、肾、脑等实质性器官的二维CEUS和血流多普勒信号, 反映正常组织和病变组织的血流灌注情况, 有人把他称为继二维超声、多普勒和彩色血流成像之后的第三次革命。

周悦, 高剑波, 郭华, 万娅敏, 张瑞芳, 潘元威, 郑州大学第一附属医院放射科CT室 河南省郑州市 450052

周悦, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的影像学表现及病理、分子生物学特性方面的研究。

国家“十一五”科技支撑计划课题基金资助项目, No. 2007BAI05B05

作者贡献分布: 本课题由周悦、高剑波、郭华及万娅敏设计; 研究过程由周悦、张瑞芳及潘元威操作完成; 数据分析由周悦完成; 论文写作由周悦与高剑波完成。

通讯作者: 高剑波, 教授, 450052, 河南省郑州市建设路1号, 郑州大学第一附属医院放射科CT室。cjr.gaojianbo@vip.163.com
电话: 0371-66913165

收稿日期: 2010-11-15 修回日期: 2011-01-10

接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-18

In vivo assessment of hepatic VX2 tumors in rabbits by real-time contrast-enhanced ultrasonography

Yue Zhou, Jian-Bo Gao, Hua Guo, Ya-Min Wan, Rui-Fang Zhang, Yuan-Wei Pan

Yue Zhou, Jian-Bo Gao, Hua Guo, Ya-Min Wan, Rui-Fang Zhang, Yuan-Wei Pan, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Jian-Bo Gao, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. cjr.gaojianbo@vip.163.com

Received: 2010-11-15 Revised: 2011-01-10

Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To assess hepatic VX2 tumors in rabbits by real-time contrast-enhanced ultrasonography.

METHODS: Twenty-five New Zealand white rabbits were used to develop hepatic VX2 tumor-bearing rabbit models. Twenty-one days after hepatic VX2 tumor implantation, the rabbits underwent color Doppler ultrasonography and real-time contrast-enhanced ultrasonography after bolus injection of SonoVue via a peripheral vein. The dynamic features of the tumors and normal liver identified by contrast-enhanced ultrasound were summarized.

RESULTS: Tumor implantation was successful in 20 (80%) rabbits. 2-D ultrasound revealed isoechoic round-shaped lesions with a periph-

eral halo and low-level echoes implying central necrosis. CDFI could detect spot-like or strip-like blood echoes in the periphery or centre of the lesions. After injection of the contrast agent, the lesions gradually showed round or branched hyperechoic enhancement during the arterial phase, which gradually decreased with the increase in enhancement of liver parenchyma. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of contrast-enhanced ultrasound were 90.6%, 96.2%, 96.7%, and 86.7% for diagnosis of small hepatic tumors whose diameters were less than or equal to 3 cm. The sensitivity of contrast-enhanced ultrasound was 85.7% for diagnosis of minute hepatic tumors whose diameters were less than 1 cm.

CONCLUSION: Real-time contrast-enhanced ultrasonography permits differential diagnosis of small liver tumors by detecting dynamic tumor blood flow.

Key Words: Real-time contrast-enhanced ultrasonography; Rabbit; Hepatic VX2 tumor

Zhou Y, Gao JB, Guo H, Wan YM, Zhang RF, Pan YW. *In vivo* assessment of hepatic VX2 tumors in rabbits by real-time contrast-enhanced ultrasonography. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 472-476

摘要

目的: 评价实时超声造影技术对VX2兔肝癌影像学模型的诊断价值。

方法: 25只肝脏种植VX2移植瘤的新西兰大白兔于种植后第21天行彩色多普勒超声检查, 并经耳缘静脉团注造影剂SonoVue, 行实时超声造影检查, 观察肿瘤及其周边正常肝组织动态超声增强表现。

结果: 20只(80%)大白兔种植成功。在二维超声上, 肿瘤为类圆形等回声肿块, 周边可见声晕, 部分中心可见低回声坏死区。彩色多普勒血流显像(CDFI)能探测到肿瘤周边或内部点、条状血流信号。注入造影剂后, 动脉相见肿瘤周边血管呈“环状”、“树枝状”渐进性回声增强, 而后门脉相随周边肝实质的强

■同行评议者
肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

化而回声逐渐减弱, 对比正常肝实质呈低回声, 表现出典型的“快进快出”的强化特点. 超声造影对于 $d \leq 3$ cm的小肝癌病灶检出率为90.6%, 特异性96.2%, 阳性预测值96.7%, 阴性预测值86.7%, 其中对于 $d < 1$ cm的微小肝癌检出率为85.7%.

结论: 实时超声造影技术可提供肿瘤的动态血流信息, 有助于微小病灶的诊断与鉴别诊断.

关键词: 实时超声造影; 兔; VX2肝癌模型

周悦, 高剑波, 郭华, 万娅敏, 张瑞芳, 潘元威. 实时超声造影技术对VX2兔肝癌影像学模型的诊断价值. 世界华人消化杂志 2011; 19(10): 472-476
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/472.asp>

0 引言

肝细胞癌是我国原发性肝癌中最常见的一种类型, 其恶性程度高, 预后较差. 临床上, 超声可作为临床筛查和诊断实体占位性病变的常用手段之一. 近年来, 实时超声造影(contrast enhanced ultrasound, CEUS)作为一项新兴技术逐渐被临床推广. 本文通过观察微泡CEUS技术对兔肝癌组织和正常肝组织的增强效应, 了解肿瘤血流灌注情况, 提高微小病灶的诊断.

1 材料和方法

1.1 材料 选取新西兰大白兔25只, 雌雄不限, 体重2-3 kg, 由河南省医学动物实验中心提供. VX2肝癌荷瘤兔由中国医科大学第一附属医院介入科馈赠.

1.2 方法

1.2.1 VX2瘤株制备: 荷瘤兔于接种后约23 d可在腹股沟区皮下扪及一实质性包块. 用10%水合氯醛7-8 mL/kg经耳缘静脉对兔行全麻, 无菌条件下剥离肿块, 寻找生长旺盛的灰白色鱼肉样组织, 置于盛有生理盐水的小烧杯中, 将瘤组织剪成小块备用.

1.2.2 VX2兔肝癌模型的制备: 动物于术前禁食12 h, 不禁水. 全麻后取仰卧位, 四肢固定于兔手术台上, 于剑突下备皮并常规消毒、铺巾. 取剑突下腹部正中切口, 暴露肝脏, 寻找肝左内叶, 在距膈面边缘约2 cm处用无齿镊刺破肝实质形成一小切口, 取约2 mm³的瘤组织块植入该切口中, 随后塞入3 mm³的明胶海绵块, 依次缝合切口. 当日给予庆大霉素4万单位腹腔内注射, 并在术后连续3 d内肌注.

1.2.3 超声检查方案: 种植后第21天对动物进行超声检查. 使用超声造影剂SonoVue(Bracco Italy), 其主要成分为六氟化硫微泡. 造影剂使用前注入生理盐水6 mL, 随即用力振摇成悬浮液. 使用日本ALOKA SSD- α 10彩色多普勒超声诊断仪, 随机配套实时造影匹配成像技术软件CnTI(contrast tuned imaging), 探头接收频率为11 MHz, 机械指数为0.05. 检查前需禁食12 h, 仰卧位固定于超声检查床上. 先常规二维超声进行肝脏扫查, 发现肿瘤即记录其部位、大小、形态、CDFI血流情况, 固定探头并同时进入CnTI状态, 经兔耳缘静脉团注造影剂0.1 mL/kg^[1], 注射后立即尾随推注2 mL生理盐水冲洗, 同时实时观察肿瘤的增强效应变化情况, 采集时间2 min, 动态数据自动保存于机器硬盘上.

1.2.4 病理学检查: 实验毕后, 用空气栓塞法处死动物, 切除整个肝脏, 观察肿瘤的大小、数目, 取肿瘤周边、瘤旁肝组织及正常肝组织大体标本, 进行石蜡包裹, HE染色.

统计学处理 数据使用SPSS13.0统计软件进行处理. 计数资料用mean \pm SD表示. 二分类资料的比较采用 χ^2 检验. 参考值范围为95%可信区间. 规定 $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 VX2兔肝癌的病理结果 25只新西兰大白兔中有20只成功长出肿瘤, 共形成瘤结节59个, 病灶直径约为0.2-4.0 cm, 59个瘤结节中 $d \leq 3$ cm的小肝癌病灶32个, 其中 $d < 1$ cm的微小肝癌7个. 其中1只死于注射空气栓塞, 1只死于麻醉过量, 1只死于感染, 2只肝脏未形成瘤灶. 种植成功25只中, 2只出现腹壁切口转移, 2只出现大网膜转移, 1只出现肺底转移结节, 5只病灶边缘出现“子灶”, 4只出现大量腹水.

大体见肿瘤呈类圆形, 灰白色, 有完整的包膜, 切面质地较韧, 部分中心可见坏死区. 低倍镜下癌细胞呈巢状分布, 肿瘤间质内血管丰富, 周边见大量纤维组织增生. 高倍镜下肿瘤细胞体积大, 呈圆形或不规则形, 胞质较少, 核大浓染, 有明显的异形性, 核分裂相多见(图1, 2).

2.2 超声影像特点 在二维超声上, 表现为类圆形等回声、低回声或略高回声肿块, 以等回声居多, 周边可见声晕, 部分病灶中心可见低回声液化坏死区. 彩色多普勒血流显像(color doppler flow imaging, CDFI)上, 7个瘤结节周边能探测到点、条状的血流信号, 3个瘤结节内部能探测到

■ 相关报道

Xu等研究指出, 实时CEUS技术可将直径 < 2 cm小肝癌的检出率提高到90%以上.

■创新盘点

本实验通过活体种植的方式建立肝癌动物模型,采用实时超声造影技术检测肿瘤生长情况.实时超声造影可有效地反映肝癌的血流灌注情况,有助于微小病灶的诊断与鉴别诊断,为临床的应用提供了实验依据.

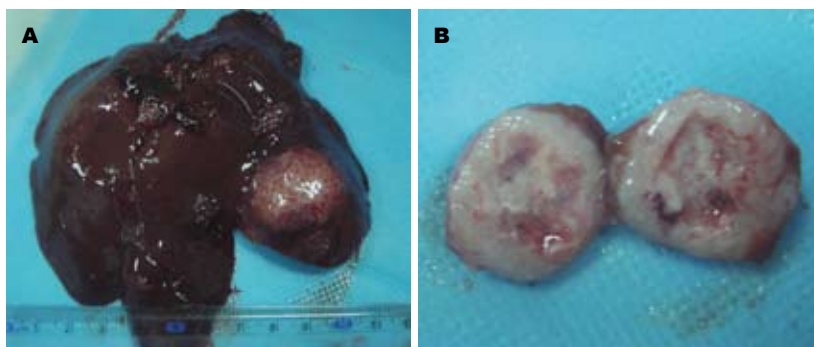


图 1 兔VX2肝癌大体标本. A: 兔VX2肝癌大体标本, 肿瘤呈类圆形结节状突出于肝轮廓之外, 有完整的包膜; B: 兔VX2肝癌大体标本切面, 呈灰白色, 中心可见坏死液化区.

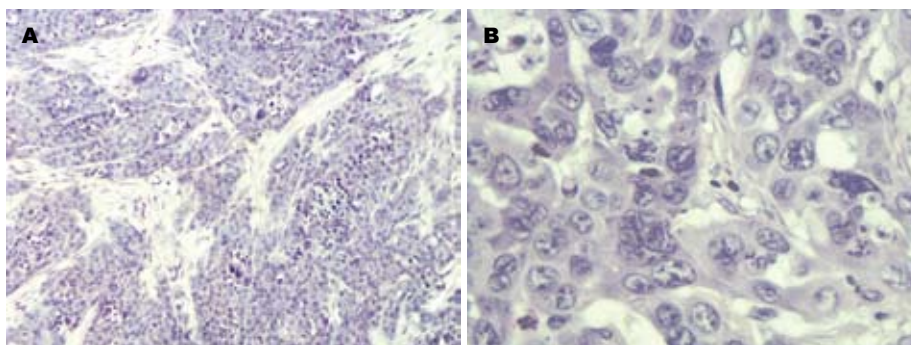


图 2 兔VX2肝癌细胞. A: 低倍镜下, 兔VX2肝癌细胞呈巢状分布, 周围见大量增生的纤维结缔组织(HE $\times 10$); B: 高倍镜下, 兔VX2肝癌细胞体积增大, 形态不规则, 核大浓染, 有明显异型性(HE $\times 40$).

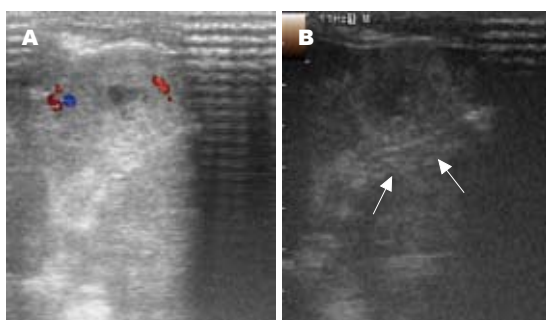


图 3 超声影像特点. A: CDFI上, 肿瘤周边可见点、条状血流信号; B: 二维超声上, 肿瘤表现为等回声, 周边见声晕, 中心可见低回声坏死区.

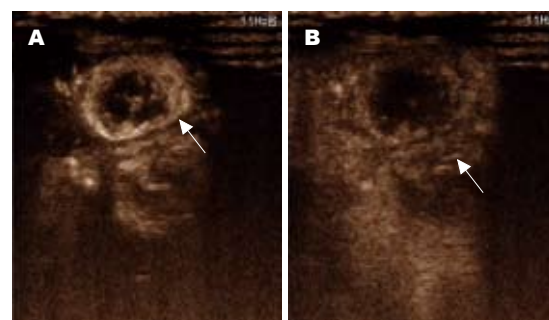


图 4 CEUS示动脉肿瘤. A: 动脉相肿瘤周边表现为环状强回声, 邻近正常肝实质为相对低回声; B: 门脉相肿瘤呈相对低回声, 正常肝实质强化较明显.

血流信号, 10个瘤结节周边及内部均能探测到血流信号. 经耳缘静脉注入造影剂后, 约3-5 s后见瘤结节周边动脉相呈“环状”、“树枝状”渐进性回声增强, 门脉相随着周边肝实质的强化而回声逐渐减弱, 对比正常肝实质呈低回声, 表现出典型的“快进快出”的强化特点, 其中动脉期表现为均匀增强20个, 不均匀增强10个(图3, 4).

2.3 肿瘤检出率情况 与病理结果比较, 二维超声共检出瘤结节46个, 大小约1.1-3.3 cm, 检出率为78%(46/59), 检出 $d \leq 3$ cm的小肝癌病灶27个, 其中2个病灶尸检后发现 $d > 3$ cm, 检出 $d < 1$ cm的微小肝癌病灶1个. 二维超声对于小肝癌和微小肝癌的检出率分别约为78.1%(25/32)和14.2%(1/7). CEUS共检出病灶54个, 大小约0.9-3.5 cm, 检出率约为91.5%(54/59), 检出 $d \leq 3$ cm的小肝癌

病灶30个, 其中1个病灶尸检后发现 $d > 3$ cm, 检出 $d < 1$ cm的微小肝癌病灶6个. CEUS对于小肝癌和微小肝癌的检出率分别约为90.6%(29/32)和85.7%(6/7)(表1). 二维超声和CEUS对小肝癌诊断的特异性分别为92.6%和96.2%, 阳性预测值分别为92.6%和96.7%, 阴性预测值分别约为78.1%和89.7%, 符合率分别约为84.7%和89.8%, 约登指数分别约为0.707和0.868. 经McNemar Test检验, 二维超声和CEUS两种方法对于 $d \leq 3$ cm小肝癌诊断的敏感性有显著性差异($P < 0.05$), 特异性无统计学意义($P > 0.05$), 与尸检结果的符合率无统计学意义($P > 0.05$), 对于 $d < 1$ cm的微小肝癌诊断的敏感性有显著性差异($P < 0.05$). 结果表明, 对于微小病灶的诊断, CEUS明显优于二维超声.

表 1 二维超声与CEUS对不同大小VX2肿瘤检出个数比较(n)

肿瘤 径线(cm)	肿瘤数	二维超声 检出数	CEUS 检出数
d<1	7	1	6
1≤d≤3	25	24	25

3 讨论

实时CEUS技术对于诊断肝脏实性占位性病变具有很高的准确性, 甚至连d<1 cm的病灶也可以检出^[2-4], 目前已和增强CT、增强MRI并列成为诊断肝脏局灶性病变的主要影像学手段^[5-8]. 造影剂SonoVue是由磷脂外壳包裹的六氟化硫微泡组成, 注射后可在人体组织器官的血管内形成血池, 对肝被膜及脾脏产生增强效应, 分为动脉相、静脉相及延迟相^[9]. CEUS能够通过了解病灶局部血供特点来诊断肝脏占位性病变, 对比剂可以清楚地反映增强后的差异, 从而提供肝脏结节占位性病变的灌注及血流动力学信息和实时血管形态学的变化^[10,11].

兔VX2肝癌影像学模型是由Shope病毒在兔皮肤诱发的鳞状细胞癌经72次传代而建立的转移性瘤细胞株^[12]. 因其肝动脉供血丰富, 易出现坏死, 表现与人类原发性肝癌类似, 被广泛应用于肝癌动物模型的制作^[13]. 在种植后第2-3周左右, 为肿瘤血管形成期. 本研究显示, 种植后第14天, 仅个别病例可在二维超声上发现边缘模糊的等回声小结节, 与邻近正常肝组织难以区分. 种植后第21天, 实验兔出现明显的厌食、精神萎靡、体质量下降等症状, 超声显示肿瘤体积增大, 其原因可能与肿瘤传代次数较多或从液氮取出后复苏时间不易控制导致瘤体活性下降、明胶海绵组织包裹影响其生长有关.

肝癌的CEUS表现具有一定的特征性. 本研究显示, 增强后VX2肝癌病灶边缘表现出典型的“快进快出”的强化特点, 动脉相呈现渐进性回声增强, 静脉相逐渐减弱, 此与国内外报道基本相符^[14-18]. CDFI虽然对于肿瘤血管的显示具有一定的敏感性^[19], 可是当病灶直径较小时, 血流速度偏低, CDFI难以确切的显示血流信号. 造影后, d≤3 cm小肝癌的检出率约为90.6%, 明显高于造影前78.1%的检出率. Xu等^[20]研究指出, 实时CEUS技术可将d<2 cm小肝癌的检出率提高到90%以上, 本实验中, 对于d<1 cm的微小肝癌, CEUS的敏感性远高于二维超声. 小肝癌由于其新生血管细小, 血流速度低, 与周边正常肝组织

声阻抗差别不大, 视频密度差异极小, 声晕显示率低, 因而影像对比分辨率弱^[21]. 气体微泡可增加声波的反射, 显著增强二维和多普勒超声的信号, 明显提高微小病灶的检出率^[22]. 对比增强CT的间歇性扫描方式, CEUS为实时动态成像, 可动态显示造影剂进入肿瘤和正常肝组织至消退的全过程, 动脉相增强较增强CT更敏感^[23-25], 可降低小肝癌诊断的假阴性率.

总之, 增强CT虽然是目前诊断肝癌普遍采用的影像学方法, 但其容易对小肝癌发生漏诊^[26,27]. CEUS能够显著提高对肝脏局灶性病变的诊断能力^[28-30], 为肝癌的诊断提供新的手段. 本实验过程中, 也存在着一些不足之处, 如每次注射微泡后只能对探头扫查切面内病灶进行实时观察, 检查过程中对操作者的技术和经验要求较高, 兔体表被毛和胃肠道内气体干扰、呼吸频率较快以及实验的样本量不足也会对检查和结果造成一定影响, 需在今后的实验和研究中加以改进.

4 参考文献

- 1 王兴华, 雷成功, 白雪萍, 石颖, 王芹秀, 乔英艳. 超声造影评价兔肝炎症性假瘤及VX2肝癌血流灌注的实验对照研究. 中国医学影像技术 2008; 24: 1153-1156
- 2 Jung EM, Schreyer AG, Schacherer D, Menzel C, Farkas S, Loss M, Feuerbach S, Zorger N, Fellner C. New real-time image fusion technique for characterization of tumor vascularisation and tumor perfusion of liver tumors with contrast-enhanced ultrasound, spiral CT or MRI: first results. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009; 43: 57-69
- 3 Weskott HP. Emerging roles for contrast-enhanced ultrasound. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008; 40: 51-71
- 4 Mita K, Kim SR, Kudo M, Imoto S, Nakajima T, Ando K, Fukuda K, Matsuoka T, Maekawa Y, Hayashi Y. Diagnostic sensitivity of imaging modalities for hepatocellular carcinoma smaller than 2 cm. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4187-4192
- 5 李锐, 华兴, 张萍, 张晓航, 郭燕丽, 丁俊, 薛雅芳, 陈朝辉. 转移性肝癌动脉相增强的实时超声造影与增强螺旋CT比较研究. 中国超声医学杂志 2007; 23: 602-604
- 6 Choi BI. Advances of imaging for hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2010; 78 Suppl 1: 46-52
- 7 Ross CJ, Rennert J, Schacherer D, Girlich C, Hoffstetter P, Heiss P, Jung W, Feuerbach S, Zorger N, Jung EM. Image fusion with volume navigation of contrast enhanced ultrasound (CEUS) with computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) for post-interventional follow-up after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) of hepatocellular carcinomas (HCC): Preliminary results. *Clin Hemorheol Microcirc* 2010; 46: 101-115
- 8 戴琳, 冯筱榕, 陈永鹏, 文维群, 许乙凯. 超声、超声造影及多层螺旋CT对小肝癌的影像学诊断. 南方医科大学学报 2008; 28: 1469-1471
- 9 Zuber-Jerger I, Schacherer D, Woenckhaus M, Jung EM, Schölmerich J, Klebl F. Contrast-enhanced ultrasound in diagnosing liver malignancy. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009; 43: 109-118
- 10 Kim TK, Jang HJ, Wilson SR. Benign liver masses:

■应用要点

实时超声造影的成像技术较常规超声可更有效地接收造影剂谐波信号, 观察实质组织的微血管结构, 显示动态的病变增强特点, 为微小病灶的诊断提供依据.

同行评价

本文可读性较好, 有助于微小病灶的诊断与鉴别诊断, 对临床工作和研究有借鉴作用。

- imaging with microbubble contrast agents. *Ultrasound Q* 2006; 22: 31-39
- 11 Dai Y, Chen MH, Yin SS, Yan K, Fan ZH, Wu W, Wang YB, Yang W. Focal liver lesions: can SonoVue-enhanced ultrasound be used to differentiate malignant from benign lesions? *Invest Radiol* 2007; 42: 596-603
- 12 闫庆, 王朝华, 李江涛, 谢晓东. 兔肝VX2肿瘤模型的建立及影像学现状. *中国介入影像与治疗学* 2007; 4: 404-407
- 13 Kuszyk BS, Boitnott JK, Choti MA, Bluemke DA, Sheth S, Magee CA, Horton KM, Eng J, Fishman EK. Local tumor recurrence following hepatic cryoablation: radiologic-histopathologic correlation in a rabbit model. *Radiology* 2000; 217: 477-486
- 14 Jang HJ, Kim TK, Wilson SR. Imaging of malignant liver masses: characterization and detection. *Ultrasound Q* 2006; 22: 19-29
- 15 Watanabe R, Matsumura M, Chen CJ, Kaneda Y, Fujimaki M. Characterization of tumor imaging with microbubble-based ultrasound contrast agent, sonazoid, in rabbit liver. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 972-977
- 16 张馨, 刘政, 高云华, 李陶, 赵雯, 谭开彬, 左松. 肝脏VX2肿瘤微泡超声造影增强机理的免疫组化观察. *临床超声医学杂志* 2006; 8: 6-8
- 17 Wilson SR, Burns PN. Liver mass evaluation with ultrasound: the impact of microbubble contrast agents and pulse inversion imaging. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 147-159
- 18 徐金锋, 吴瑛, 熊奕, 彭启慧, 董发进, 谢明星. 超声造影对肝脏实质性小病灶的早期诊断价值. *华中科技大学学报(医学版)* 2008; 37: 266-269
- 19 Du WH, Yang WX, Xiong XQ, Wang X, Zhou Y, Wang H. Contrast-enhanced ultrasonographic imaging diagnosis on assessment of vascularity in liver metastatic lesions. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3610-3613
- 20 Xu HX, Xie XY, Lu MD, Liu GJ, Xu ZF, Zheng YL, Liang JY, Chen LD. Contrast-enhanced sonography in the diagnosis of small hepatocellular carcinoma ≤ 2 cm. *J Clin Ultrasound* 2008; 36: 257-266
- 21 冯健, 李征毅, 张家庭, 李泉水, 贡雪灏, 刘伟宗. 实时超声造影检测兔微小VX2肝肿瘤的实验研究. *临床和实验医学杂志* 2009; 8: 6-8
- 22 白雪萍, 雷成功, 王兴华. SonoVue实时超声造影评价肝VX2肿瘤血流灌注的实验研究. *山西医药杂志* 2006; 35: 111-113
- 23 Catalano O, Sandomenico F, Nunziata A, Raso MM, Vallone P, Siani A. Transient hepatic echogenicity difference on contrast-enhanced ultrasonography: sonographic sign and pitfall. *J Ultrasound Med* 2007; 26: 337-345
- 24 Krix M, Kiessling F, Essig M, Herth F, Karcher A, Le-Huu M, Kauczor HU, Delorme S. Low mechanical index contrast-enhanced ultrasound better reflects high arterial perfusion of liver metastases than arterial phase computed tomography. *Invest Radiol* 2004; 39: 216-222
- 25 Kumada T, Nakano S, Toyoda H, Hayashi K, Kiriya S, Sone Y, Tanikawa M, Hisanaga Y, Yamamoto A, Takeshima K, Hibi T, Yabashi T, Noda T, Sassa T, Furukawa M, Ogawa S. Assessment of tumor hemodynamics in small hepatocellular carcinoma: comparison of Doppler ultrasonography, angiography-assisted computed tomography, and pathological findings. *Liver Int* 2004; 24: 425-431
- 26 Giorgio A, Ferraioli G, Tarantino L, de Stefano G, Scala V, Scarano F, Coppola C, Del Viscovo L. Contrast-enhanced sonographic appearance of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: comparison with contrast-enhanced helical CT appearance. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 183: 1319-1326
- 27 Quaia E, D'Onofrio M, Palumbo A, Rossi S, Bruni S, Cova M. Comparison of contrast-enhanced ultrasonography versus baseline ultrasound and contrast-enhanced computed tomography in metastatic disease of the liver: diagnostic performance and confidence. *Eur Radiol* 2006; 16: 1599-1609
- 28 齐信王, 陈方红, 朱夏蓓, 汤贞炎, 洪晓萍, 孙终霞. 实时超声造影技术在肝内实质性占位病变中的应用. *浙江实用医学* 2007; 12: 242-244
- 29 Quaia E, Calliada F, Bertolotto M, Rossi S, Garioni L, Rosa L, Pozzi-Mucelli R. Characterization of focal liver lesions with contrast-specific US modes and a sulfur hexafluoride-filled microbubble contrast agent: diagnostic performance and confidence. *Radiology* 2004; 232: 420-430
- 30 Li R, Guo Y, Hua X, He Y, Ding J, Guo A, Luo M. Characterization of focal liver lesions: comparison of pulse-inversion harmonic contrast-enhanced sonography with contrast-enhanced CT. *J Clin Ultrasound* 2007; 35: 109-117

编辑 李薇 电编 何基才

5-HT、SP在海洛因戒断、脱毒、复吸大鼠直肠组织中的表达

洪艳, 梁文妹, 夏白娟, 胡赟, 韩晶, 李一欣, 谢莉

洪艳, 梁文妹, 夏白娟, 胡赟, 韩晶, 李一欣, 谢莉, 贵阳医学院组织学与胚胎学教研室 贵州省贵阳市 550004
洪艳, 硕士, 副教授, 主要从事神经内分泌方面的研究。

贵州省社会发展科技攻关计划基金资助项目, No. 黔科合S字(2007)1048

作者贡献分布: 制作动物模型由洪艳、夏白娟、胡赟、韩晶及李一欣完成; 标本制备及染色由李一欣与谢莉完成; 采集、分析、解释数据、起草文章、统计分析由洪艳完成; 酝酿、设计及指导实验由梁文妹完成, 并对文章的知识性内容作批评性审阅。

通讯作者: 梁文妹, 教授, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院组织学与胚胎学教研室. wenmeiliang@126.com

电话: 0851-6908567

收稿日期: 2010-11-07 修回日期: 2011-01-04

接受日期: 2011-01-11 在线出版日期: 2011-02-18

Expression of 5-HT and SP in the rectum of rats during heroin abstinence, detoxification or relapse

Yan Hong, Wen-Mei Liang, Bai-Juan Xia, Yun Hu, Jing Han, Yi-Xin Li, Li Xie

Yan Hong, Wen-Mei Liang, Bai-Juan Xia, Yun Hu, Jing Han, Yi-Xin Li, Li Xie, Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Program of Guizhou Province, No. QIAN KE HE S ZI (2007)1048

Correspondence to: Professor Wen-Mei Liang, Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. wenmeiliang@126.com

Received: 2010-11-07 Revised: 2011-01-04

Accepted: 2011-01-11 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and substance P (SP) in the rectum of rats during heroin abstinence, detoxification, and relapse.

METHODS: Male Sprague-Dawley rats were divided into normal control group (NCG), saline control group (SCG), and experiment group (EG). The EG group was further divided into heroin abstinence group (HAG), methadone detoxification group (MDG), and heroin relapse group (HRG). Rectum tissue samples were taken from each group to perform immunohistochemistry to detect the expression of 5-HT and SP.

RESULTS: Compared with the NCG and SCG

groups, the immunostaining density of 5-HT- and SP-positive cells was greater, the numbers of 5-HT- and SP-positive cells increased (5-HT: 10 d: 5.09 ± 3.39 vs 3.16 ± 2.05 , 2.80 ± 2.13 ; 24 d: 5.05 ± 3.04 vs 3.16 ± 2.05 , 2.81 ± 1.85 ; SP: 10 d: 2.55 ± 1.35 vs 1.29 ± 0.86 , 1.37 ± 0.93 ; 24 d: 2.57 ± 1.27 vs 1.29 ± 0.86 , 1.39 ± 0.79 , all $P < 0.05$), and the mean grey degree of 5-HT- and SP-positive cells decreased ($F = 36.642$, 4.583 , $P < 0.05$) in the HAG and HRG groups. Compared with the NCG and SCG groups, there were no statistical significances in the immunostaining density, numbers, and mean grey degree of 5-HT- and SP- positive cells in the MDG group (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: Altered expression of 5-HT and SP in the tunica mucosa recti of rats during heroin abstinence or relapse suggests that 5-HT and SP can regulate the recovery of digestive function during heroin abstinence, detoxification, and relapse.

Key Words: 5-Hydroxytryptamine; Substance P; Rectum; Heroin abstinence; Heroin detoxification; Heroin relapse; Methadone; Rat

Hong Y, Liang WM, Xia BJ, Hu Y, Han J, Li YX, Xie L. Expression of 5-HT and SP in the rectum of rats during heroin abstinence, detoxification or relapse. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(5): 477-482

摘要

目的: 探讨海洛因戒断、脱毒及复吸期间大鼠直肠内5-羟色胺(5-HT)、P物质(SP)表达的改变。

方法: 正常♂SD大鼠, 随机分为实验组、盐水对照组和正常对照组, 实验组分别建立海洛因依赖戒断模型, 美沙酮脱毒治疗模型和海洛因复吸模型。取各组大鼠直肠组织, 采用免疫组织化学SABC法及图像分析方法进行研究。

结果: 与正常对照组及盐水对照组比较, 实验组大鼠直肠内的5-HT、SP细胞免疫染色加深; 图像分析5-HT、SP阳性细胞的细胞计数增多(5-HT: 10 d: 5.09 ± 3.39 vs 3.16 ± 2.05 , 2.80 ± 2.13 ; 24 d: 5.05 ± 3.04 vs 3.16 ± 2.05 ,

■背景资料

近年来, 药物滥用对胃肠道功能的影响已引起国内外学者的广泛关注。已有研究证实药物滥用将导致直肠病的发病率增加。胃肠激素的改变与消化系统疾病的发生关系密切。5-HT作为一种神经递质, 对机体免疫系统和神经内分泌系统都有调节作用。P物质作为神经递质的调节因子, 可促进消化系统平滑肌收缩, 加强结肠的集团推进运动, 刺激肠黏膜分泌水和电解质。目前国内外有关机体直肠神经内分泌的形态学和机能学的改变及其关系的研究尚少, 形态学方面的研究尤其少见。

■同行评议者

赵春玲, 副教授, 潍坊医学院细胞生物学教研室

■研究前沿

阿片类药物依赖戒断机制及治疗的研究一直是医学界关注的热点。海洛因是目前非法滥用范围最广、危害程度最为严重的阿片类药物,海洛因依赖治疗中最难解决的问题是脱毒后的复吸。美沙酮维持治疗已成为全球阿片类毒品依赖维持疗法中应用最为广泛的方法之一。

2.81 ± 1.85 ; SP: 10 d: 2.55 ± 1.35 vs 1.29 ± 0.86 , 1.37 ± 0.93 ; 24 d: 2.57 ± 1.27 vs 1.29 ± 0.86 , 1.39 ± 0.79 , 均 $P < 0.05$), 平均灰度值低于正常及盐水对照组($F = 36.642$, 4.583 , $P < 0.05$)。实验组与正常及盐水对照组比较, 5-HT、SP阳性细胞免疫染色、细胞计数及平均灰度值变化差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

结论: 5-HT、SP在大鼠直肠黏膜表达的改变, 提示二者参与海洛因戒断、脱毒和复吸期间消化系统功能恢复的调节过程。

关键词: 5-羟色胺; P物质; 直肠; 海洛因戒断; 海洛因脱毒; 海洛因复吸; 美沙酮; 大鼠

洪艳, 梁文妹, 夏白娟, 胡赞, 韩晶, 李一欣, 谢莉. 5-HT、SP在海洛因戒断、脱毒、复吸大鼠直肠组织中的表达. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 477-482

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/477.asp>

0 引言

阿片类药物依赖戒断机制及治疗的研究一直是医学界关注的热点。海洛因是目前非法滥用范围最广、危害程度最为严重的阿片类药物,吸食大量海洛因后,体内内源性阿片样物质因受到负反馈调节而减少,从而引起机体神经-内分泌-免疫网络的功能紊乱^[1]。海洛因依赖治疗中最难解决的问题是脱毒后的复吸。因此,如何有效降低复吸率,是当今脱毒治疗急需解决的首要问题^[2]。美沙酮维持治疗是针对海洛因等阿片类毒品依赖者采取的一种替代治疗方法,目前已成为全球阿片类毒品依赖维持疗法中应用最为广泛的方式之一^[3]。近年来,药物滥用对胃肠道功能的影响已引起国内外学者的广泛关注^[4]。已有研究证实药物滥用将导致直肠癌的发病率增加,并成为溃疡性结肠炎的诊断依据之一^[5]。而直肠黏膜内分泌细胞数量及种类较多,且胃肠激素的改变与消化道疾病的发生关系密切^[6]。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)是一种在人体内广泛存在的生物活性胺,哺乳动物体内大约60%-90%的5-HT存在于胃肠道,主要由肠嗜铬细胞合成。5-HT作为一种神经递质,对机体免疫系统和神经内分泌系统都有调节作用^[7]。P物质(substance P, SP)是最早发现的一种神经肽,属于哺乳动物速激肽家族;在消化道主要分布于肠神经系统及黏膜内分泌细胞^[8]。本课题组曾对海洛因依赖大鼠结肠及直肠黏膜内5-HT和SP的表达进行研究^[9,10]。目前国内外有关海洛因脱毒、复吸时机体胃肠胰神经内分泌改变的形态

学原位研究尚少,尚未见到海洛因脱毒、复吸时直肠内激素定位及表达情况的系统报道。本实验通过建立大鼠海洛因戒断、美沙酮脱毒及复吸模型,应用免疫组织化学SABC法及图像分析,对5-HT、SP在大鼠海洛因戒断、美沙酮脱毒及复吸期间直肠黏膜的定位和表达进行研究,为探讨海洛因戒断和复吸的机制提供形态学资料,并试图为临床通过调整胃肠激素治疗海洛因成瘾提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 成年SD大鼠35只,♂,体质量180-220 g,由贵阳医学院实验动物中心提供。海洛因:纯度为61.48%,由贵州省公安厅提供。美沙酮:汉方制药厂提供。

1.2 方法

1.2.1 分组:按配对原则随机分为正常对照组(NCG)5只、盐水对照组(SCG)15只和实验组(EG)15只,EG又分为海洛因戒断组(heroine withdrawal group, HWG)、美沙酮脱毒治疗组(methadone detoxication group, MDG)和海洛因复吸组(heroine relapse group, HRG),由贵阳医学院动物中心饲养员喂养。

1.2.2 造模: (1)海洛因戒断大鼠模型^[11]: EG按体质量逐日注射海洛因药液。首日剂量为3 mg/kg, 2次/d(上午8:00, 下午15:00), 每日递增剂量为3 mg/kg, 连续皮下注射海洛因9 d, 至第9天剂量为27 mg/kg, 第10天EG取5只大鼠腹腔注射0.8 mg纳洛酮催瘾, 观察并记录戒断症状30 min, 出现扭体、湿狗样抖、跳跃、站立、齿颤、清理皮毛、上睑下垂等戒断症状, 依照Maldonad等的戒断症状评分标准评定, 判定大鼠海洛因戒断模型成功建立。戒断组大鼠1 h内处死; (2)美沙酮脱毒治疗模型^[12]: 将已成瘾大鼠注射美沙酮脱毒治疗, 连续注射6 d, 每日剂量递减, 依次为5、4、3、2、1、0.5 mg/kg, 观察并记录, 脱毒治疗第7天(实验第17天)使用纳洛酮催瘾并观察, MDG大鼠与NCG和SCG比较, 无明显戒断症状, 将MDG大鼠处死; (3)海洛因复吸大鼠模型: 将剩余5只美沙酮脱毒6 d后的大鼠再次注射海洛因, 注射剂量9 mg/kg首日, 1次/d(上午8:00), 逐日递增剂量为3 mg/kg, 让大鼠再次染毒, 制作复吸模型。复吸7 d(实验第24天)后将复吸组大鼠处死。SCG按体质量每日注射与EG相当剂量的生理盐水, 并与EG同时处死; NCG不予任何处理, 按时喂养, 同期处死。

1.2.3 取材及标本制备: 分别取NCG、SCG和

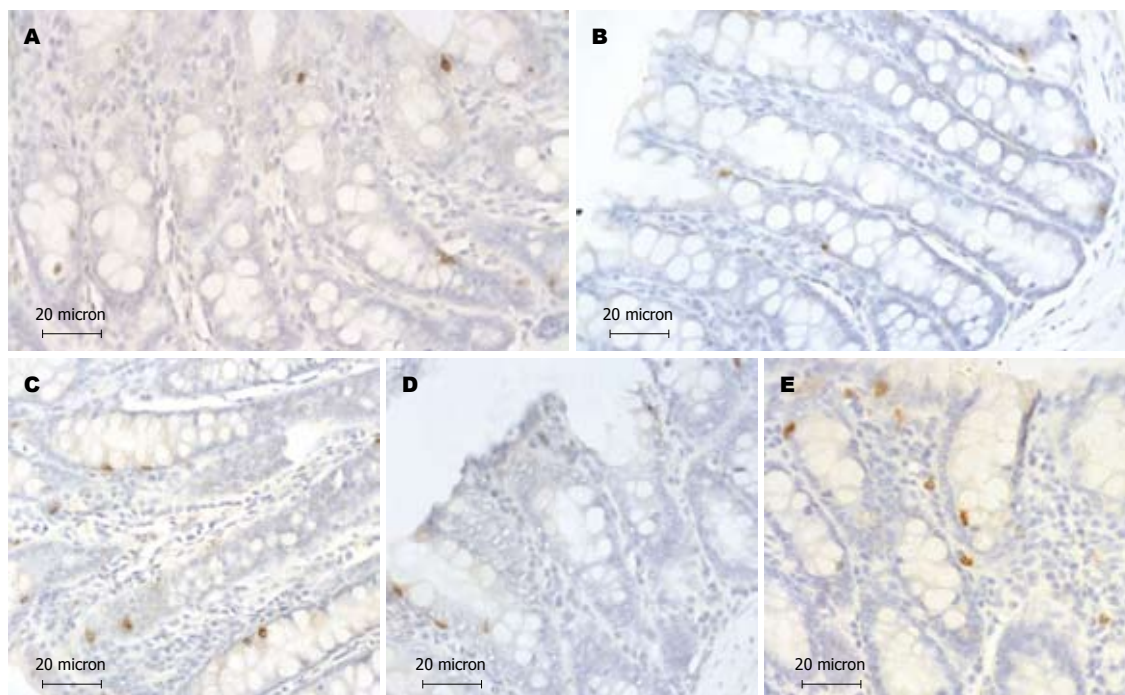


图 1 5-HT阳性细胞的光镜观察(SABC法 $\times 400$). A: NCG; B: SCG第17天; C: HWG; D: MDG; E: HRG.

■ 相关报道

Capasso研究显示5-HT受体阻断剂可明显减弱体外培养豚鼠回肠对吗啡戒断的反应,表明血清素能和阿片系统之间存在功能上的密切联系.SP是直接调控吗啡等阿片类药物镇痛功能和耐受性的关键物质.

EG(戒断、脱毒和复吸)大鼠直肠标本,多聚甲醛液固定,常规石蜡包埋,制成4 μm 厚的连续切片,每例每个观察指标均观察切片3张以上,切片间隔56 μm .

1.2.4 免疫组织化学SABC法:按免疫组织化学SABC法进行染色,分别显示5-HT和SP阳性细胞.主要步骤为:切片常规脱蜡至水,室温10%甲醇- H_2O_2 10 min,正常羊血清(1:50)室温下封闭20 min,依次滴加兔5-HT(1:1 000,中国人民解放军第四军医大学提供)、SP(1:100,北京中杉金桥生物技术有限公司)抗血清4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,羊抗兔IgG(1:100)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min, SABC复合物(1:100,武汉博士德生物工程公司提供)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min, DAB- H_2O_2 液显色,苏木精轻度复染细胞核,中性树胶封片.方法对照: PBS缓冲液代替特异性抗血清,余步骤同上.

1.2.5 图像分析:随机选取NCG、SCG和实验各组直肠切片各5张,在40倍物镜下,每张切片随机选取5个视野,分别计数每个视野内有核阳性5-HT、SP细胞数.同样的方法选取视野,用Bio-Mias图像分析系统检测5-HT、SP阳性细胞的平均灰度值.

统计学处理 应用SPSS11.5软件包对实验数据进行单因素方差分析,实验数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示. $P < 0.05$ 为具有显著性.

2 结果

2.1 直肠5-HT阳性细胞的形态学观察和图像分析

2.1.1 免疫组织化学观察:光镜下,正常组大鼠5-HT阳性细胞经DAB- H_2O_2 液显色,可见免疫反应产物呈棕黄色或棕黑色细颗粒状存在于细胞质内.5-HT阳性细胞主要分布于黏膜上皮细胞间,形态多样,呈圆形、椭圆形、锥形、梭形等,有的细胞顶端可见细长突起抵达肠腔或小肠腺腔(图1A).方法对照切片未见阳性反应细胞. SCG和NCG相比,5-HT阳性细胞的形态、数量、分布及免疫染色强度均未见明显变化(图1B). MDG与SCG和NCG比较,大鼠直肠5-HT阳性细胞的数量、形态、分布和免疫染色强度未见明显变化(图1D).与正常和SCG比较,HWG、HRG大鼠直肠5-HT阳性细胞的形态分布未见明显变化,但免疫染色加深,细胞数量增多(图1C, E).

2.1.2 图像分析结果:NCG、SCG及MDG大鼠直肠5-HT阳性细胞计数及平均灰度值的差异无统计学意义($P > 0.05$),与正常及SCG相比,HWG、HRG大鼠直肠5-HT阳性细胞计数增多,平均灰度值降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,表1,图2).

2.2 直肠SP阳性细胞的形态学观察和图像分析

2.2.1 免疫组织化学观察:光镜下,正常组大鼠直肠SP阳性细胞数量较少,散在分布于肠腺上皮细胞之间,多呈卵圆形或不规则形.经DAB- H_2O_2 液显色,可见免疫反应产物位于细胞质内,呈棕黄色细颗粒状(图3A).方法对照切片未见阳性反应细胞. SCG与NCG比较,大鼠SP阳性细胞的数量、形态、分布和免疫染色强度未见明显变

■ 创新盘点

本实验观察到戒断及复吸组大鼠直肠5-HT的表达增高可能参与肠黏膜损伤的调节过程。戒断及复吸组大鼠直肠黏膜表达SP增高,提示SP与阿片肽之间存在复杂的作用机制,可能是机体对抗海洛因依赖引起肠道功能紊乱的调节作用之一。脱毒组大鼠戒断症状有所改善,5-HT含量的降低可能提示美沙酮维持疗法有一定疗效。SP表达接近正常,提示SP参与脱毒后消化系功能恢复的调节过程。

表 1 大鼠直肠5-HT阳性细胞计数/视野 (mean ± SD)

分组	10 d	17 d	24 d
NCG	3.16 ± 2.05	3.16 ± 2.05	3.16 ± 2.05
SCG	2.80 ± 2.13	2.92 ± 1.77	2.81 ± 1.85
EG	5.09 ± 3.39 ^a	3.03 ± 2.01 ^c	5.05 ± 3.04 ^a

^a*P* < 0.05 vs NCG、SCG和EG 17 d; ^c*P* < 0.05 vs NCG、SCG。

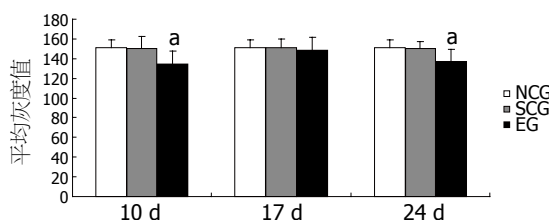


图 2 各组大鼠直肠5-HT阳性细胞的平均灰度值。 ^a*P* < 0.05 vs NCG、SCG和EG 17 d。

化(图3B)。与SCG和NCG比较,HWG、HRG SP阳性细胞的免疫染色加深,细胞数量增多(图3C、E);MDG则未见明显变化(图3D)。

2.2.2 图像分析结果: NCG、SCG及MDG SP阳性细胞计数及平均灰度值的差异无统计学意义 (*P* > 0.05), 与正常和SCG比较,HWG、HRG SP阳性细胞计数增多,平均灰度值降低,差异有统计学意义 (*P* < 0.05, 表2, 图4)。

3 讨论

海洛因依赖及戒断后,由于外源性阿片类物质的作用及其对内源性阿片类物质的影响,导致阿片受体、内源性阿片肽及其受其调节的神经内分泌系统的改变,表现出以迷走神经功能亢进为主的戒断症状。海洛因成瘾者的戒断反应,实质上是机体内部适应与暂时不适应相互转化的表现,这一过程是建立在神经内分泌的变化、调节和失调基础上的^[1]。戒断症状的存在,是造成海洛因依赖者脱毒治疗后复吸的重要因素。在临床观察所见的戒断症状中,消化道功能紊乱者尤其普遍存在,如消化不良、食欲减退、腹胀、腹泻或便秘等^[4]。另有研究表明,吗啡戒断大鼠易出现肠系膜局部微循环障碍^[13]。

5-HT是参与调节胃肠道运动和分泌功能的重要神经递质和旁分泌信号分子,95%来源于肠道黏膜层的肠嗜铬细胞。迷走神经刺激、胃肠内压对胃肠壁的作用等均可使肠嗜铬细胞释放5-HT^[14]。5-HT信号系统异常可导致胃肠道动力及分泌功能异常、内脏高敏感性,与慢性便秘、肠易激综合征(irritable bowel syndrome,

表 2 大鼠直肠SP阳性细胞计数/视野 (mean ± SD)

分组	10 d	17 d	24 d
NCG	1.29 ± 0.86	1.29 ± 0.86	1.29 ± 0.86
SCG	1.37 ± 0.93	1.38 ± 0.75	1.39 ± 0.79
EG	2.55 ± 1.35 ^a	1.48 ± 0.71 ^c	2.57 ± 1.27 ^a

^a*P* < 0.05 vs NCG、SCG和EG 17 d; ^c*P* < 0.05 vs NCG、SCG。

IBS)、腹泻及功能性消化不良等胃肠道功能性疾病密切相关^[15-17]。Capasso研究显示5-HT受体阻断剂可明显减弱体外培养豚鼠回肠对吗啡戒断的反应,表明血清素能和阿片系统之间在功能上的密切联系^[18]。本实验通过建立海洛因依赖动物模型,注射纳络酮诱发急性戒断症状,结果显示戒断组大鼠直肠内5-HT阳性细胞的数量较NCG及SCG明显增多,免疫染色增强,推测肠黏膜5-HT的表达增高与海洛因戒断时消化系反应密切相关。

SP为含11个氨基酸残基的多肽,在消化道主要分布于肠神经系统及黏膜内分泌细胞,可与5-HT共存于肠嗜铬细胞^[19]。SP可作为神经递质的调节因子,可促进消化系平滑肌收缩,加强结肠的集团推进运动,刺激肠黏膜分泌水和电解质^[20]。IBS发病过程中出现的肠道应激反应、肠道感染及内脏高敏感性均与SP密切相关^[21,22]。Wang等^[23]报道便秘型IBS大鼠肠神经系统及中枢神经系统中SP和c-fos蛋白的表达异常,并推测SP的表达异常直接参与IBS的发病机制。夏颀等观察IBS患者回盲部肠黏膜SP、SP受体及5-HT的改变及其相互关系,实验结果表明认为SP、SP受体和5-HT共同作用,在IBS的发病机制中起重要作用^[24]。研究证实大鼠脑神经活性肽SP片段(SP1-7)在吗啡戒断期间明显增高^[25]。在大鼠阻断SP特异性NK1受体将减少纳洛酮给药后引起的戒断综合征的出现^[26]。本实验结果显示戒断组大鼠直肠黏膜表达SP增高,提示SP与阿片肽之间存在复杂的作用机制,二者共同参与海洛因戒断时消化系黏膜损伤的调节过程。

美沙酮系阿片受体激动剂,由于其特有的药理学作用而被广泛地应用于阿片类成瘾的治疗。具有与阿片受体亲和力大,维持时间长,成瘾潜力小等特点,口服美沙酮可控制戒断症状^[3]。本实验采用美沙酮剂量逐日递减法建立美沙酮脱毒动物模型,用免疫组织化学及图像分析法研究MDG大鼠直肠黏膜5-HT、SP的含量变化,结果显示5-HT、SP含量较HWG大鼠显著降低,与

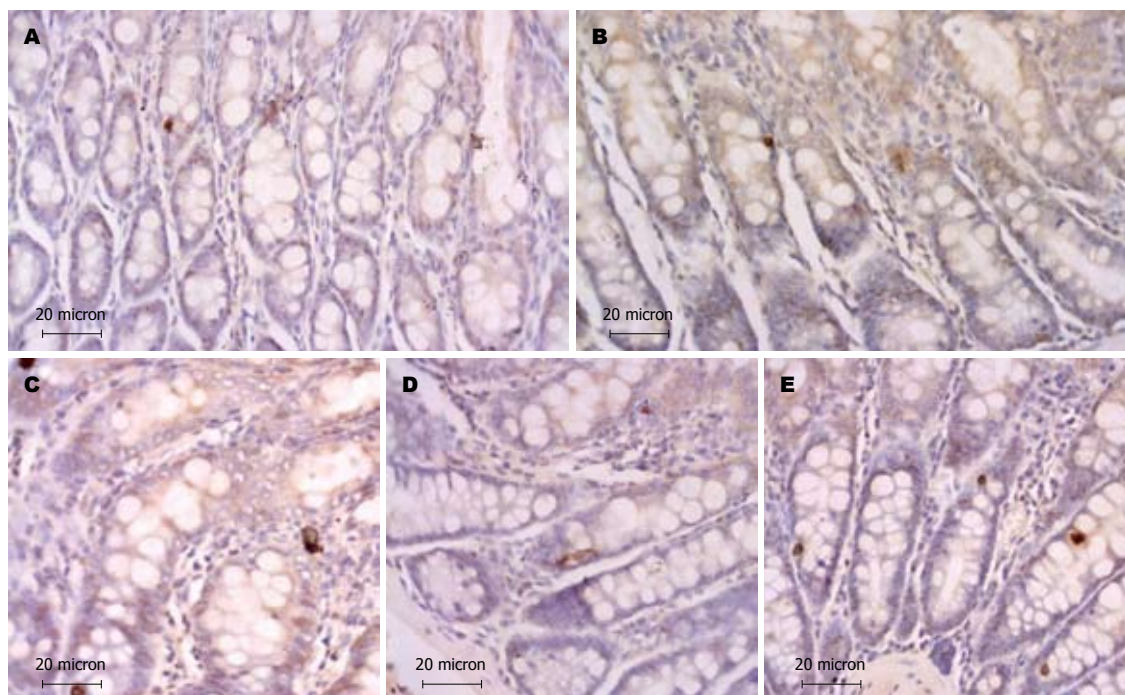


图 3 SP阳性细胞的光镜观察(SABC法×400). A: NCG; B: SCG第17天; C: HWG; D: MDG; E: HRG.

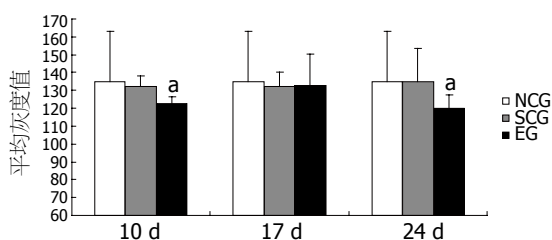


图 4 各组大鼠直肠SP阳性细胞的平均灰度值. ^a $P < 0.05$ vs NCG、SCG和EG 17 d.

NCG及SCG比较无统计学意义. 国内外研究发现, 阿片类戒断后的焦虑情绪和5-HT系统功能有关, 5-HT含量的改变可能是稽延性戒断症状的主要机制之一^[27]. 血清中5-HT的浓度改变可作为观测稽延性戒断症状程度的客观指标, 其降低的程度可作为疗效的评定参考^[28]. 本实验观察到MDG大鼠戒断症状有所改善, 5-HT含量的降低可能提示美沙酮维持疗法有一定疗效. SP表达接近正常, 提示SP参与脱毒后消化系统功能恢复的调节过程.

叶峻等^[29]研究证实海洛因复吸大鼠脑内NA、DA、5-HT等神经递质的含量升高, 而且随复吸次数增多而升高. 本实验通过模拟海洛因依赖者脱毒后复吸的过程, 研究5-HT、SP在大鼠直肠含量的改变, 结果表明复吸后5-HT、SP的含量再次升高, 与叶峻等的结果相似. 这与本课题组前期对海洛因依赖期间大鼠结肠内分泌细胞的研究结果类似^[10]. 5-HT(1A)拮抗剂可

阻断口服大豆吗啡对小肠蠕动的抑制作用^[30]. 本研究显示海洛因长期依赖引起5-HT改变可能是阿片肽再次作用引起消化系黏膜的损伤所致, 增多的5-HT也参与肠黏膜损伤的调节过程.

SP是直接调控吗啡等阿片类药物镇痛功能和耐受性的关键物质^[31]. 国内外研究发现长期吗啡依赖后脑组织中SP含量升高^[25]. Liang等^[32]研究显示 β_2 肾上腺素能受体对慢性吗啡依赖大鼠脊髓背根神经节内SP表达水平升高具有重要作用, 并证实其参与长期吗啡依赖时神经元适应的调节. Kojima等^[33]研究表明阿片受体激动剂洛哌丁胺对NK3受体诱发的5-HT释放具有明显的抑制作用, 并推测该抑制作用是由位于神经元内的 κ 和 δ 受体所介导的. 本实验结果显示复吸组大鼠直肠黏膜表达SP增高, 提示脑肠肽与阿片肽之间存在复杂的作用机制, 可能是机体对抗海洛因依赖引起肠道功能紊乱的调节作用之一.

总之, 本研究结果显示在海洛因依赖戒断期间, 直肠黏膜5-HT、SP表达出现明显变化, 提示胃肠激素参与海洛因戒断、脱毒和复吸时消化功能紊乱的调节过程, 为进一步研究其具体机制提供形态学原位资料, 并为下一步临床通过调整胃肠激素治疗海洛因成瘾提供形态学资料.

4 参考文献

- 1 许艳, 徐满英. 阿片成瘾戒断机制及治疗的研究现状. 哈尔滨医科大学学报 2005; 39: 198-201
- 2 周文华, 张富强, 刘惠芬, 唐甩恩, 张亚海, 刘胜, 赖苗

■应用要点

本文的相关工作将为深入理解阿片类毒品依赖性形成机制提供重要的形态学依据, 并为临床通过调整体内激素、细胞因子、神经肽的水平来治疗海洛因成瘾者奠定理论基础.

■同行评价

本文选题新颖, 设计合理, 为探讨海洛因戒断和复吸的机制提供形态学资料。

- 3 军, 陈为升, 顾钧, 朱华强, 杨国栋. 海洛因复吸模型、机制和干预的研究进展. *中国药物依赖性杂志* 2006; 15: 206-209
- 4 Tramullas M, Martínez-Cué C, Hurlé MA. Chronic methadone treatment and repeated withdrawal impair cognition and increase the expression of apoptosis-related proteins in mouse brain. *Psychopharmacology* (Berl) 2007; 193: 107-120
- 5 Banach T, Zurowski D, Gil K, Weisbrodt NW, Rosenfeld G, Thor PJ. Peripheral mechanisms of intestinal dysmotility in the morphine tolerant and dependent rats. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 73-82
- 6 Dimitrijević I, Kalezić N, Ristić J, Bojović O, Dimitrijević N. Digestive system damage caused by substance abuse. *Acta Chir Jugosl* 2008; 55: 133-138
- 7 Kilkens TO, Honig A, Fekkes D, Brummer RJ. The effects of an acute serotonergic challenge on brain-gut responses in irritable bowel syndrome patients and controls. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 865-874
- 8 Lesurtel M, Soll C, Graf R, Clavien PA. Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 940-952
- 9 Brehmer A. Structure of enteric neurons. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2006; 186: 1-91
- 10 洪艳, 梁文妹, 刘霞. 5-HT、生长抑素及P物质在海洛因依赖大鼠直肠的定位和表达. *解剖学报* 2009; 40: 463-468
- 11 洪艳, 梁文妹. 海洛因依赖对大鼠结肠内分泌细胞表达5-HT及生长抑素的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 976-980
- 12 潘贵书, 徐国强, 李淑芳. 海洛因成瘾大鼠模型的建立. *贵阳医学院学报* 1997; 12(增刊): 46
- 13 叶峻, 蒙子卿, 韦世秀, 刘佳娟, 郑毅, 韦献良, 黄绍明, 周燕. 海洛因成瘾复吸动物模型的建立. *广西医科大学学报* 2003; 20: 832-825
- 14 李娜, 王亚龙, 刘秀平, 张秋燕, 潘颖. 654-2对吗啡戒断大鼠肠系膜微循环的影响. *中国微循环* 2008; 12: 158-163
- 15 Hansen MB, Witte AB. The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 193: 311-323
- 16 丁健华, 傅传刚, 赵荣华. 5-羟色胺在胃肠道功能性疾病中的研究现状. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2405-2408
- 17 孙刚, 杨云生, 彭丽华, 王巍峰. 肠易激综合征大鼠内脏敏感性和脊髓背角5-HT和c-fos的表达. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2718-2722
- 18 张晓敏, 林志辉. 5-羟色胺转运体基因多态性与肠易激综合征的相关性. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1790-1794
- 19 Capasso A. Methysergide selective inhibition of opioid acute physical dependence in isolated tissues. *Med Chem* 2008; 4: 309-312
- 20 Koon HW, Pothoulakis C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1088: 23-40
- 21 江彬, 施征, 吴焕淦. 血管活性肠肽、P物质与肠易激综合征关系的研究近况. *中国现代临床医学* 2005; 4: 53-56
- 22 Chua AS, Keeling PW, Dinan TG. Role of cholecystokinin and central serotonergic receptors in functional dyspepsia. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1329-1335
- 23 Ma XP, Tan LY, Yang Y, Wu HG, Jiang B, Liu HR, Yang L. Effect of electro-acupuncture on substance P, its receptor and corticotropin-releasing hormone in rats with irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5211-5217
- 24 Wang WF, Yang YS, Peng LH, Sun G. Alternation of substance P-containing neural pathways in a rat model of irritable bowel syndrome with rectal distension. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 211-218
- 25 夏岷, 刘希双, 鞠辉. 肠易激综合征患者肠黏膜SP、SPR和5-HT的变化. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3169-3173
- 26 Zhou Q, Carlsson A, Botros M, Fransson R, Sandström A, Gordh T, Hallberg M, Nyberg F. The C-terminal amidated analogue of the substance P (SP) fragment SP(1-7) attenuates the expression of naloxone-precipitated withdrawal in morphine dependent rats. *Peptides* 2009; 30: 2418-2422
- 27 Wang X, Douglas SD, Peng JS, Zhou DJ, Wan Q, Ho WZ. An in vitro model of morphine withdrawal manifests the enhancing effect on human immunodeficiency virus infection of human T lymphocytes through the induction of substance P. *Am J Pathol* 2006; 169: 1663-1670
- 28 李树春, 刘晓兰, 刘燕, 李峰. 阿片类物质依赖与相关神经递质. *中国药物依赖性杂志* 2005; 14: 162-166
- 29 刘金华, 吴爱勤. 海洛因依赖稽延性戒断症状的研究进展. *中国药物依赖性杂志* 2008; 17: 169-171
- 30 叶峻, 韦献良, 韦世秀, 蒙子卿, 刘佳娟, 梁莹. 海洛因成瘾复吸大鼠脑组织超微结构和部分神经递质的变化. *解剖学杂志* 2004; 27: 624-629
- 31 Kaneko K, Iwasaki M, Yoshikawa M, Ohinata K. Orally administered soymorphins, soy-derived opioid peptides, suppress feeding and intestinal transit via gut mu(1)-receptor coupled to 5-HT(1A), D(2), and GABA(B) systems. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299: G799-G805
- 32 Guan JS, Xu ZZ, Gao H, He SQ, Ma GQ, Sun T, Wang LH, Zhang ZN, Lena I, Kitchen I, Elde R, Zimmer A, He C, Pei G, Bao L, Zhang X. Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell* 2005; 122: 619-631
- 33 Liang DY, Shi X, Li X, Li J, Clark JD. The beta2 adrenergic receptor regulates morphine tolerance and physical dependence. *Behav Brain Res* 2007; 181: 118-126
- 34 Kojima S, Ikeda M, Kamikawa Y. Loperamide inhibits tachykinin NK3-receptor-triggered serotonin release without affecting NK2-receptor-triggered serotonin release from guinea pig colonic mucosa. *J Pharmacol Sci* 2005; 98: 175-180

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

Smo和Gli1蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达及临床意义

孙波, 张蕾, 李颖霞, 符仲标, 邵惠杰, 温洪涛

孙波, 李颖霞, 符仲标, 邵惠杰, 温洪涛, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

张蕾, 郑州大学第一附属医院肿瘤科 河南省郑州市 450052
孙波, 在读硕士, 主要从事消化系统肿瘤的基础与临床研究。

河南省高校杰出科研人才创新工程基金资助项目, No. 2007 KYCX005

作者贡献分布: 本课题由温洪涛与孙波设计; 研究过程及统计分析由孙波、李颖霞及邵惠杰完成; 研究所用的材料由张蕾与温洪涛提供; 论文写作由孙波与符仲标完成。

通讯作者: 温洪涛, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 河南省郑州大学第一附属医院消化内科. wenhongtao68@163.com
电话: 0371-66295932

收稿日期: 2010-11-11 修回日期: 2011-01-09

接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-18

Clinicopathological significance of expression of Smo and Gli1 in esophageal squamous cell carcinoma

Bo Sun, Lei Zhang, Ying-Xia Li, Zhong-Biao Fu, Hui-Jie Shao, Hong-Tao Wen

Bo Sun, Ying-Xia Li, Zhong-Biao Fu, Hui-Jie Shao, Hong-Tao Wen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Lei Zhang, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by: the Innovation Project Foundation for Outstanding Talents in Universities in Henan Province, No. 2007KYCX005

Correspondence to: Hong-Tao Wen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 40 Daxue Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. wenhongtao68@163.com

Received: 2010-11-11 Revised: 2011-01-09

Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of Smo and Gli1 proteins in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: The protein expression of Smo and Gli1 was detected by immunohistochemistry in 60 ESCC specimens, 45 tumor-adjacent atypical hyperplastic tissue specimens, and 60 normal esophageal mucosal specimens.

RESULTS: The expression of Smo and Gli1

protein was significantly higher in ESCC than in atypical hyperplastic tissue and normal esophageal mucosal tissue (53/60 vs 22/45, 19/60; 54/60 vs 18/45, 16/60; all $P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of the two proteins between atypical hyperplasia tissue and normal esophageal mucosal tissue (both $P > 0.05$). Overexpression of Smo and Gli1 proteins was related with lymph node metastasis and the depth of tumor invasion in ESCC (both $P < 0.05$). The expression of Smo protein was significantly correlated with that of Gli1 protein in ESCC ($r = 0.452$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Abnormal sonic hedgehog signaling may play an important role in the development and evolution of ESCC, and this abnormality is associated with Smo protein overexpression, which can upregulate the expression of Gli1 protein, a downstream transcription factor in the sonic hedgehog signal transduction pathway. Combined detection of Smo and Gli1 proteins may be helpful to evaluate the prognosis of ESCC.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; Smo; Gli1; Sonic hedgehog; Immunohistochemistry

Sun B, Zhang L, Li YX, Fu ZB, Shao HJ, Wen HT. Clinicopathological significance of expression of Smo and Gli1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 483-487

摘要

目的: 探讨Sonic hedgehog信号通路中Smo和Gli1蛋白在食管鳞状细胞癌(ESCC)组织中的表达及临床意义。

方法: 采用免疫组织化学二步法分别检测60例ESCC、45例癌旁异型增生及60例食管正常黏膜组织中Smo和Gli1蛋白的表达, 并分析两者的表达水平与临床病理因素的关系。

结果: Smo和Gli1蛋白在ESCC组织中表达强度显著高于癌旁异型增生和正常食管黏膜组

■背景资料

Sonic hedgehog信号通路在胚胎时期组织分化发育调节中起巨大作用, 但近来越来越多的研究显示该信号通路在人类多种肿瘤呈异常激活, 并且该信号关键蛋白阻滞剂能显著减慢体外肿瘤细胞的生长。

■同行评议者

欧希龙, 副教授, 东南大学中大医院消化科

■创新盘点

本文首次采用免疫组织化学法联合检查Smo和Gli1蛋白在食管鳞状细胞癌组织、癌旁异型增生组织及食管正常黏膜组织中的表达情况,并分析他们两与食管鳞状细胞癌发生发展的关系。

织(53/60 vs 22/45, 9/60; 54/60 vs 18/45, 16/60, 均 $P<0.05$),而Smo和Gli1蛋白在癌旁异型增生及食管正常黏膜组织中的表达差异无统计学意义。Smo和Gli1蛋白在ESCC组织中的表达强度与肿瘤的浸润深度和淋巴结转移有关(均 $P<0.05$)。相关分析显示Smo和Gli1蛋白在ESCC组织中的表达呈正相关($r = 0.452$, $P<0.01$)。

结论: Sonic hedgehog信号通路异常激活与ESCC的发生发展密切相关,在食管鳞状细胞癌中Sonic hedgehog信号通路的激活可能是高表达的Smo蛋白通过上调其下游的转录因子Gli1蛋白来发挥作用的,联合检查两者对ESCC患者预后的判断有一定的临床意义。

关键词: 食管鳞状细胞癌; Smo; Gli1; Sonic hedgehog; 免疫组织化学

孙波, 张蕾, 李颖霞, 符仲标, 邵惠杰, 温洪涛. Smo和Gli1蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 483-487

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/483.asp>

0 引言

Sonic hedgehog信号通路是人类胚胎发育过程中调控细胞增殖和组织分化的重要信号通路^[1,2]。大量研究表明该信号通路在人类多种肿瘤中异常激活,并对这些肿瘤的生长起着促进作用^[3-6]。Smo和Gli1蛋白是该信号通路中的两个关键蛋白,目前有关联合检测这两个蛋白在ESCC中的表达及相关性研究鲜见报道。本文采用免疫组织化学法检测Smo和Gli1蛋白在食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)、癌旁异型增生及食管正常黏膜组织中的表达水平,探讨Sonic hedgehog信号通路中Smo和Gli1蛋白与ESCC发生发展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 60例新鲜ESCC标本均收集于食管癌高发区河南省安阳市肿瘤医院2009-01/2009-11手术切除的标本,其中男36例,女24例;患者年龄35-78岁,其中 ≥ 60 岁者33例, <60 岁者27例,平均年龄为 60.6 ± 9.5 岁。所有患者术前均未行放疗、化疗及免疫治疗。所有标本分别在癌灶、癌旁3 cm以内及远端正常食管黏膜组织处取材,经10%中性缓冲甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋切片,分别用于HE染色和免疫组织化学染色。全部标本均经组织学证实:癌灶组织均为ESCC,

其中组织学分级 I 级11例, II 级25例, III级24例;浅层浸润组11例(黏膜固有层或黏膜下层),深层浸润组49例(肌层或外膜层);有淋巴结转移22例,无淋巴结转移38例。60例癌旁组织中45例组织学证实异型增生,60例远端组织均证实为食管正常黏膜组织。兔抗人Smo多克隆抗体购于Abcam公司。兔抗人Gli1多克隆抗体购于北京博奥森、PV9000免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法 免疫组织化学PV9000二步法严格按说明书进行, Smo抗体稀释度为1:100, Gli1抗体稀释度为1:200, DAB显色,苏木素复染,透明封片。用已知阳性的胰腺癌切片作为阳性对照,以PBS代替一抗作阴性对照。参考Yoshikawa等^[7]判断方法并做适当修改,按照细胞膜和(或)胞质内及细胞核和(或)胞质内出现黄色或棕黄色颗粒的细胞视为阳性细胞,随机选取5个高倍视野,计数阳性细胞数的百分比: $<5\%$ 为(-), $\geq 5\%$ 且 $<35\%$ 为(+), $\geq 35\%$ 且 $<65\%$ 为(++), $\geq 65\%$ 为(+++)。

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件进行数据分析,表达强度比较用等级资料非参数秩和检验,相关性采用Spearman等级相关分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 Smo蛋白在ESCC组织中的表达水平及其与ESCC临床病理因素的关系 Smo蛋白在胞膜及胞质均可见表达,以胞膜为主(图1)。Smo蛋白在ESCC、癌旁异型增生及正常食管黏膜组织中的表达强度逐级降低,在ESCC组织中的表达强度显著高于异型增生和正常黏膜组织($P<0.01$,表1),而其在异型增生和正常组织中的表达差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。Smo蛋白在ESCC中的表达强度与患者的性别、年龄、肿瘤分化程度无关($P>0.05$),而与肿瘤的浸润深度及淋巴结转移有关($P<0.05$,表2)。

2.2 Gli1蛋白在ESCC组织中的表达水平及其与ESCC临床病理因素的关系 Gli1蛋白主要在胞核及胞质中表达(图2)。Gli1蛋白在ESCC、癌旁异型增生及食管正常黏膜组织中的表达强度逐级降低,其在ESCC组织中的表达强度显著均高于异型增生和正常黏膜组织(均 $P<0.01$,表1),而其在异型增生和正常黏膜组织中的表达差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。Gli1蛋白在ESCC中的表达与患者的性别、年龄、肿瘤分化程度无关($P>0.05$),而与肿瘤的浸润深度及淋巴结转移有

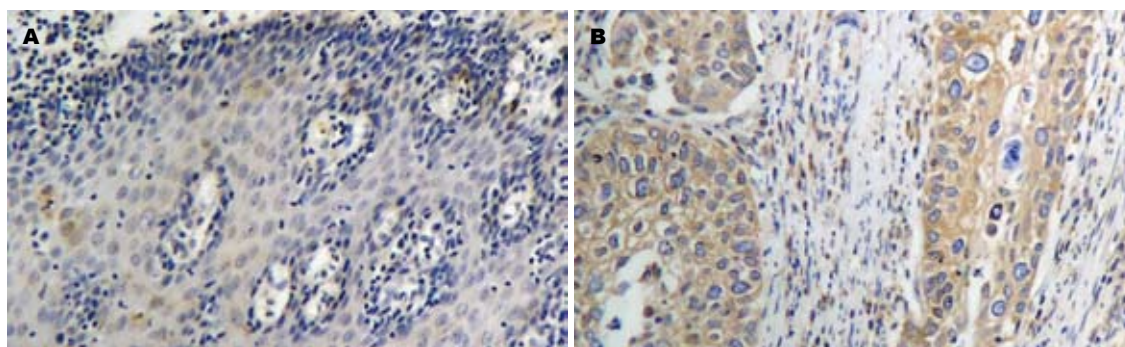


图 1 Smo蛋白的表达(SP × 100). A: 正常黏膜阴性; B: 鳞癌组织强阳性.

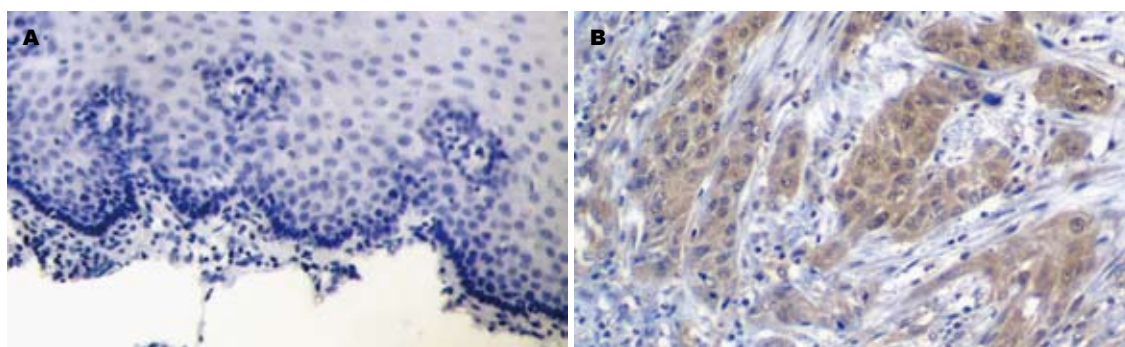


图 2 Gli1蛋白的表达(SP × 100). A: 正常黏膜阴性; B: 鳞癌组织强阳性.

■应用要点

Smo和Gli1蛋白的表达可能与食管鳞状细胞癌发生发展有关,联合检查两蛋白可用于评价食管鳞状细胞的预后、指导治疗.

表 1 不同类型食管组织中Smo与Gli1蛋白的表达情况

组织类型	n	Smo(n)				Mean rank	Gli1(n)				Mean rank
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
鳞癌组织	60	7	17	21	15	115.81 ^a	6	16	21	17	119.99 ^a
异型增生	45	23	13	8	1	72.00	27	12	4	2	67.89
正常组织	60	41	12	7	0	58.44	44	11	5	0	57.34

^a $P < 0.05$ vs 异型增生和正常组织.

关($P < 0.05$, 表2).

2.3 食管鳞状细胞组织中Smo与Gli1蛋白表达的相关性分析 Spearman等级相关分析显示: Smo和Gli1蛋白在ESCC组织表达呈正相关($r = 0.432$, $P < 0.05$).

3 讨论

食管癌是一种常见的消化系恶性的肿瘤,严重危害人类的身心健康.至今食管癌的确切发病机制尚未清楚,但可以肯定其形成是一个多因素,多步骤的过程.他涉及到一系列原癌基因异常的激活以及抑癌基因突变导致的失活,进而引起一些信号传导通路的异常.因此找到参与食管癌发生发展的主要因子或信号通路,对食管癌的防治及预后将具有重要的意义. Sonic

hedgehog信号通路是一个进化保守的信号通路,从低等动物(果蝇)到高等动物(人类)均普遍存在.该信号通路主要由3部分组成: Hh配体蛋白(Shh、Ihh、Dhh)、跨膜受体蛋白(PTCH, Smo)、下游转录因子(Gli1、Gli2、Gli3)^[8,9].其中Smo蛋白是sonic hedgehog信号通路中的信息转换器,他能够把细胞外的Shh信号转换成细胞内的Gli1信号^[8,10],对Sonic hedgehog信号通路具有激活作用.而Gli1蛋白是Sonic hedgehog信号通路中的转录因子,可将SHh信号传导至核内后对靶基因起转录激活作用^[11].研究认为Sonic hedgehog信号通路在胚胎的正常发育中起着重要作用,并且在胚胎发育成熟后该信号通路就处于失活状态,但近来研究发现在人类多种肿瘤中Sonic hedgehog信号通路存在异常激活^[12-15].

■同行评价

本文创新性较好,设计合理,具有一定的临床参考意义。

表 2 Smo和Gli1蛋白在食管鳞癌组织中的表达与临床病理因素的关系

因素	n	Smo(n)				mean mark	P值	Gli1(n)				mean mark	P值
		-	+	++	+++			-	+	++	+++		
性别													
男	36	4	9	11	12	32.81		4	7	12	13	32.99	
女	24	3	8	10	3	27.04	0.191	2	9	9	4	26.77	0.158
年龄(岁)													
≥60	33	5	10	9	9	29.45		3	9	11	10	31.03	
<60	27	2	7	12	6	31.78	0.286	3	7	10	7	29.85	0.786
分化程度													
I	11	1	3	6	1	28.64		1	3	1	6	35.64	
II	25	3	8	9	5	29.80		3	4	9	9	33.34	
III	24	3	6	6	9	33.12	0.611	2	9	11	2	25.19	0.123
浸润深度													
浅层	11	4	4	1	2	20.09		4	4	2	1	17.27	
深层	49	3	13	20	13	32.84	0.022	2	12	19	16	33.47	0.004
淋巴结转移													
有	22	0	6	8	8	36.36		0	4	9	9	37.41	
无	38	7	11	13	7	27.11	0.039	6	12	12	8	26.50	0.015

目前认为Sonic hedgehog信号通路激活方式有两种:一是配体依赖性激活方式,即因为Shh配体的过度表达而引起此信号通路中目的基因的转录,导致肿瘤的发生和发展;二是配体非依赖性激活方式:即PTCH、Smo及Gli1等基因发生功能获得性突变,从而导致Sonic hedgehog信号通路的异常激活,促进肿瘤的发生和发展^[16-19]。在基底细胞癌、髓母细胞瘤等恶性肿瘤的研究中发现PTCH基因的突变是Sonic hedgehog通路激活和肿瘤发生的关键^[18-20]。在胃癌、结直肠癌和胃肠间质瘤等消化系统肿瘤的研究中发现PTCH1、Gli1及Smo基因有不同程度的表达上调^[21-23]。Ma等^[24]对食管癌中的研究也可见PTCH1和Gli1基因在癌组织中表达上调,并且作者还发现用Smo拮抗剂环杷明(cyclopamine)处理后的食管癌细胞生长减慢,凋亡增加。还有学者把Gli1转染至在正常胰腺导管上皮细胞株后,可异常激活Sonic Hedgehog信号通路下游基因的转录,促进细胞的癌变^[25]。这些都说明了Sonic hedgehog通路激活在肿瘤中是一种普遍现象,并且与PTCH、Smo和Gli1异常表达有关。本实验结果发现Smo和Gli1蛋白在食管正常黏膜及异型增生组织中不表达或弱表达,但在ESCC组织中的表达强度明显增高,均显著高于癌旁异型增生及正常食管黏膜组织,说明了Smo和Gli1蛋白与ESCC的发生密切相关,支持了Sonic hedgehog信号通路在ESCC中呈活化状态这一观点^[26]。与Ma等^[24]

研究结果基本一致。在本研究中我们还发现癌旁异型增生和食管正常黏膜组织中Smo和Gli1蛋白的表达差异无统计学意义。可见Smo和Gli1蛋白虽然参与了ESCC发生,但Smo和Gli1蛋白高表达并不是食管癌变的早期事件,而他们在促进食管异型增生向ESCC发展这一环节可能起着重要的作用。但有报道,在食管癌前病变的Barrett's食管组织中Sonic hedgehog通路存在异常激活,认为该信号通路激活是食管癌发生的早期事件^[27],与本研究结果不一致,这也许是鳞癌与腺癌之间不同,这有待进一步探讨。此外本研究还发现Smo和Gli1蛋白在ESCC中的表达均与肿瘤的浸润深度和淋巴结转移密切相关,随着肿瘤的浸润深度和淋巴结转移的增加而增加,与已有的研究结果基本一致^[28]。提示了Smo和Gli1蛋白在ESCC的浸润及转移中可能发挥着重要的作用。也暗示了我们Smo和Gli1蛋白高表达的肿瘤可能具有更强的侵袭能力,而严重影响患者的预后^[7,28]。使得通过联合检查Smo和Gli1蛋白来判断ESCC患者的预后有了依据。

另外我们还发现在ESCC组织中Smo和Gli1蛋白表达呈正相关($r = 0.432, P < 0.05$)。推测高表达的Smo蛋白可能通过上调其下游转录因子Gli1蛋白的表达,而引起Sonic hedgehog信号通路异常激活,共同促进ESCC的发生及发展。

4 参考文献

- 1 Pasca di Magliano M, Hebros M. Hedgehog signal-

- ling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 903-911
- 2 李忠武, 刘鲁英, 田萌萌, 游伟程, 李吉友. 蒙古沙鼠幽门螺杆菌相关性胃炎Sonic hedgehog基因、IL-1 β 及TNF- α 的表达. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 7-13
- 3 Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ. The hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5924-5928
- 4 Kasper M, Regl G, Frischauf AM, Aberger F. GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer* 2006; 42: 437-445
- 5 Feng YZ, Shiozawa T, Miyamoto T, Kashima H, Kurai M, Suzuki A, Ying-Song J, Konishi I. Overexpression of hedgehog signaling molecules and its involvement in the proliferation of endometrial carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1389-1398
- 6 Stecca B, Ruiz i Altaba A. The therapeutic potential of modulators of the Hedgehog-Gli signaling pathway. *J Biol* 2002; 1: 9
- 7 Yoshikawa R, Nakano Y, Tao L, Koishi K, Matsumoto T, Sasako M, Tsujimura T, Hashimoto-Tamaoki T, Fujiwara Y. Hedgehog signal activation in oesophageal cancer patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy. *Br J Cancer* 2008; 98: 1670-1674
- 8 Ruiz i Altaba A, Sánchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 361-372
- 9 Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, Banerji SK, Ghosh R, Roy R, Banerjee S. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia* 2007; 21: 949-955
- 10 Murone M, Luoh SM, Stone D, Li W, Gurney A, Armanini M, Grey C, Rosenthal A, de Sauvage FJ. Gli regulation by the opposing activities of fused and suppressor of fused. *Nat Cell Biol* 2000; 2: 310-312
- 11 Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, Beachy PA. Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade. *Science* 2002; 297: 1559-1561
- 12 Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004; 432: 324-331
- 13 Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 2004; 431: 707-712
- 14 郭杰芳, 高军, 李兆申. Hedgehog-GLI信号通路在胰腺癌发生中的作用. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1137-1140
- 15 黄海林, 胡志前, 王为民, 王毅, 蔡清萍, 王强. Hedgehog信号传导通路在乳腺癌中表达增强. *基础医学与临床* 2009; 29: 522-525
- 16 戎祯祥, 方驰华, 朱达坚, 刘胜军. Sonic hedgehog信号通路Smo蛋白及其下游转录因子Gli1蛋白在胃癌组织中的表达及其意义. *南方医科大学学报* 2006; 26: 1728-1730
- 17 Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgård R. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene* 2004; 330: 101-114
- 18 Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 2003; 425: 846-851
- 19 Rubin LL, de Sauvage FJ. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 1026-1033
- 20 Daya-Grosjean L, Couvé-Privat S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett* 2005; 225: 181-192
- 21 Ma X, Chen K, Huang S, Zhang X, Adegboyega PA, Evers BM, Zhang H, Xie J. Frequent activation of the hedgehog pathway in advanced gastric adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1698-1705
- 22 Bian YH, Huang SH, Yang L, Ma XL, Xie JW, Zhang HW. Sonic hedgehog-Gli1 pathway in colorectal adenocarcinomas. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1659-1665
- 23 Yoshizaki A, Nakayama T, Naito S, Wen CY, Sekine I. Expressions of sonic hedgehog, patched, smoothed and Gli-1 in human intestinal stromal tumors and their correlation with prognosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5687-5691
- 24 Ma X, Sheng T, Zhang Y, Zhang X, He J, Huang S, Chen K, Sultz J, Adegboyega PA, Zhang H, Xie J. Hedgehog signaling is activated in subsets of esophageal cancers. *Int J Cancer* 2006; 118: 139-148
- 25 顾燕萍, 李兆申, 高军, 龚燕芳, 吴红玉, 金晶, 郭杰芳, 满晓华. Gli基因在胰腺癌中的表达变化及其临床意义. *胃肠病学* 2007; 12: 620-622
- 26 Sims-Mourtada J, Izzo JG, Apisarnthanarax S, Wu TT, Malhotra U, Luthra R, Liao Z, Komaki R, van der Kogel A, Ajani J, Chao KS. Hedgehog: an attribute to tumor regrowth after chemoradiotherapy and a target to improve radiation response. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6565-6572
- 27 Wang DH, Clemons NJ, Miyashita T, Dupuy AJ, Zhang W, Szczepny A, Corcoran-Schwartz IM, Wilburn DL, Montgomery EA, Wang JS, Jenkins NA, Copeland NA, Harmon JW, Phillips WA, Watkins DN. Aberrant epithelial-mesenchymal Hedgehog signaling characterizes Barrett's metaplasia. *Gastroenterology* 2010; 138: 1810-1822
- 28 Mori Y, Okumura T, Tsunoda S, Sakai Y, Shimada Y. Gli-1 expression is associated with lymph node metastasis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2006; 70: 378-389

编辑 李薇 电编 何基才

肿瘤相关基因RASAL1在结肠癌中的表达及临床意义

程桂丹, 陈洪, 陆枫林

■背景资料

我国恶性肿瘤的发病率和死亡率呈明显上升趋势, 已成为城乡居民的首要死因, 而消化系恶性肿瘤发生率最高, 约占所有恶性肿瘤的60%-70%, 近年来我国结肠癌发病趋势明显增高, 关于结肠癌分子水平的变化情况一直是研究的热点。RASAL1是新近发现的一种Ras活性的调节蛋白, 已有报道其可能参与了多种肿瘤的发生, 但RASAL1及其mRNA在结肠癌中的表达情况却鲜有报道。

程桂丹, 东南大学临床医学院 江苏省南京市 210009
陈洪, 陆枫林, 东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009
程桂丹, 硕士, 主要从事胃肠道疾病的基础与临床研究。
江苏省自然科学基金资助项目, No. 2008301
作者贡献分布: 实验操作、数据分析、论文写作由程桂丹、陆枫林完成; 实验所需经费由陆枫林提供; 陆枫林审核; 陈洪合作。
通讯作者: 陆枫林, 教授, 210009, 江苏省南京市鼓楼区丁家桥87号, 东南大学附属中大医院消化科, lufenglinmytutor@163.com
电话: 025-83272034
收稿日期: 2010-10-23 修回日期: 2010-12-02
接受日期: 2010-12-07 在线出版日期: 2011-02-18

Clinical significance of RASAL1 expression in colorectal carcinoma

Gui-Dan Cheng, Hong Chen, Feng-Lin Lu

Gui-Dan Cheng, Clinical Medicine of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Hong Chen, Feng-Lin Lu, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. 2008301

Correspondence to: Professor Feng-Lin Lu, Department of Gastroenterology, Zhongda Hospital, Southeast University, 78 Dingjiaqiao, Gulou District, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. lufenglinmytutor@163.com
Received: 2010-10-23 Revised: 2010-12-02
Accepted: 2010-12-07 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To investigate the expression of RASAL1 (Ras GTPase-activating-like protein 1) mRNA and protein in human colorectal carcinoma (CRC) and to analyze its correlation with tumor clinicopathological features.

METHODS: Fifty paraffin-embedded surgical CRC specimens, matched tumor-adjacent tissue specimens, and normal colorectal tissue specimens were used to detect the distribution of RASAL1 by immunohistochemistry (IHC). Twenty fresh CRC specimens, matched tumor-adjacent tissue specimens, and normal colorectal tissue specimens were used to determine the levels of RASAL1 mRNA expression by RT-PCR. The correlation between RASAL1 expression and tumor clinicopathological parameters was analyzed.

RESULTS: RASAL1 was mainly localized in the cytoplasm of glands cells. The positive rate of RASAL1 protein expression in CRC was significantly lower than those in tumor-adjacent tissue and normal colorectal tissue [46% (23/50) vs 85% (17/20), 96% (48/50), both $P < 0.05$]. The positive rate of RASAL1 mRNA expression was also significantly lower in CRC than in tumor-adjacent tissue and normal colorectal tissue [50% (10/20) vs 90% (18/20), 95% (19/20), both $P < 0.05$]. The expression of RASAL1 protein was positively related with that of RASAL1 mRNA ($r = 0.686$, $P < 0.01$), but negatively with tumor differentiation degree ($P < 0.05$), invasive depth ($P < 0.01$), lymph node metastasis ($P < 0.05$), and TNM stage ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The expression of RASAL1 mRNA and protein is reduced in CRC. RASAL1 expression is negatively related to tumor progression. RASAL1 may be a novel therapeutic target for CRC.

Key Words: Colorectal carcinoma; Ras GTPase-activating-like protein 1; Ras; Immunohistochemistry; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Cheng GD, Chen H, Lu FL. Clinical significance of RASAL1 expression in colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 488-493

摘要

目的: 探讨Ras三磷酸鸟苷酶激活样蛋白(RASAL1)及基因在人结肠癌中的表达及其与临床病理参数间的关系。

方法: 收集2009-04/2010-05经手术切除的结肠腺癌标本50例作为研究组, 相应正常组织为对照组, 做成蜡块标本; 其中20例另取其癌组织、癌旁组织及正常组织的新鲜标本; 用免疫组织化学染色观察50例蜡块标本RASAL1蛋白的表达; 用RT-PCR检测20例新鲜标本RASAL1 mRNA的表达, 并分析其与临床病理参数的关系。

结果: RASAL1蛋白主要在细胞质中表达; RASAL1蛋白在结肠癌中的阳性表达率明

■同行评议者

唐世刚, 教授, 大连大学附属中山医院内科

显低于癌旁组织及正常组织[46%(23/50) vs 85%(17/20), 96%(48/50), 均 $P<0.05$]; RASAL1 mRNA在结肠癌中的阳性表达率较癌旁组织及正常组织明显减低[50%(10/20) vs 90%(18/20), 95%(19/20), 均 $P<0.05$], RASAL1蛋白与mRNA的表达呈明显正相关($r=0.686$, $P<0.01$), 与肿瘤的分化程度($P<0.05$)、侵袭深度($P<0.01$)、淋巴结转移($P<0.05$)、TNM分期($P<0.05$)呈负相关。

结论: RASAL1在结肠腺癌组织中低表达, 且与分化程度及进展阶段负相关; RASAL1有可能成为结肠癌治疗的一个新靶点。

关键词: 结肠癌; Ras三磷酸鸟苷酶激活样蛋白; Ras; 免疫组织化学; 反转录聚合酶链式反应

程桂丹, 陈洪, 陆枫林. 肿瘤相关基因RASAL1在结肠癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 488-493
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/488.asp>

0 引言

结肠癌形成、进展和转移与癌基因、抑癌基因不可逆的积累突变和失调有关。其中, Ras基因与肿瘤发生发展的关系引起人们较高的关注。Ras基因是第一个被鉴定的人类癌基因, 对于Ras基因、蛋白及其参与的信号转导通路的研究一直是分子肿瘤学的研究热点之一。RASAL1基因是近年新发现的一种钙离子依赖性Ras活性调节基因, 研究发现RASAL1基因可能参与了部分恶性肿瘤的发生^[1], 目前国外已有研究表明在结肠癌中存在RASAL1的表达缺失, 并发现RASAL1的表达可能与结肠癌的进展有关^[2,3], 而国内尚无报道。本实验拟采用免疫组织化学染色及RT-PCR的方法检测结肠腺癌组织、癌旁组织及正常组织中RASAL1的表达情况, 探讨其与结肠癌临床病理参数间的关系, 旨在为结肠癌的临床诊断及治疗提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2009-04/2010-05东南大学附属中大医院普外科经手术切除的结肠腺癌标本50例作为研究组, 相应正常组织为对照组(术前未接受放、化疗或其他针对肿瘤的治疗, 肿瘤组织均取自肿瘤中心非坏死部位)其中男29例, 女21例; 年龄为32-78(平均 56.1 ± 13.7)岁。50例标本均经术后病理切片证实, 并结合临床资料进行TNM分期, 石蜡包埋。其中20例另取肿瘤组织、癌旁组织及正常组织的新鲜手术标本, 均在离

体后0.5 h内迅速取材, 并分别放入经DEPC水处理过的冻存管中置于-70℃冰箱中备用。剩余癌旁组织经甲醛固定, 石蜡包埋, 常规连续4 μm切片, 用于常规病理诊断及免疫组织化学染色。羊抗人RASAL1多克隆抗体为英国Abcam公司产品(工作浓度1:100, 用PBS稀释), SP试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司, TRIzol、PCR试剂盒购自宝生物(TaKaRa)工程大连有限公司, RASAL1引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 RASAL1蛋白检测: 采用链霉素抗生素蛋白-过氧化物酶免疫组织化学染色方法(SP法)。50例石蜡包埋标本切片脱蜡后入蒸馏水10 min, 3%双氧水室温孵育5-10 min; 蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min; 抗原修复, 自然冷却, PBS冲洗5 min×3次; 加入正常山羊血清工作液封闭, 室温孵育10 min; 弃去血清, 加一抗工作液, 4℃孵育过夜; PBS冲洗5 min×3次; 加二抗工作液, 37℃孵育15 min, PBS冲洗5 min×3次; 加入辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液, 37℃孵育15 min, PBS冲洗5 min×3次; DAB显色10 min; 脱水、透明、封片、镜下观察。实验结果判定用已知阳性组织作为阳性对照, 以正常山羊血清取代一抗作为阴性对照, 以磷酸缓冲液代替一抗作为空白对照。RASAL1的表达参照Fromowitz方法^[4]在高倍镜下对着色反应作如下评分, 分别记为: 阳性细胞数<5%为阴性记0分, 5%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分。阳性强度以无着色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。两者相加, <2为阴性(-), 2-3为弱阳性(+), 4-5为中度阳性(++), 6-7为强阳性(+++)。

1.2.2 RT-PCR测定RASAL1 mRNA的表达: 20例新鲜标本处理后, 总RNA抽取(TRIzol试剂盒), 用紫外分光光度仪测量总RNA浓度和纯度, -70℃保存。按照试剂盒操作说明取1 μg RNA进行cDNA合成。RASAL1 cDNA引物序列: 上游: 5'-TGGATTTCTCTTCTTGCGATTCT-3', 下游: 5'-TGTTGGTCCCGAAGGTCAA-3', 扩增片段长度72 bp; 内参β-actin引物序列: 上游: 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3', 下游: 5'-CACGATGGAGGGGCGGACTCATC-3', 扩增片段长度240 bp。PCR反应体系为10×缓冲液5 μL, dNTP(10 mmol/L)0.5 μL, 目的基因上、下游引物各0.8 μL, 内参上、下游引物各0.3 μL,

■研究前沿

Ras基因是第一个被鉴定的人类癌基因, 对于Ras基因、蛋白及其参与的信号转导通路的研究一直是分子肿瘤学的研究热点之一。

■相关报道

Ohta等通过对152例不同组织学分期的结直肠癌的分析发现, RASAL1蛋白在腺癌及进展期腺癌(直径>1 cm)中表达下降, 但在小腺癌(直径<1 cm)中没有检测到明显下降, 即随着细胞从早期腺癌到腺癌, RASAL1表达呈下降趋势, 这一发现提示结直肠癌的进展可能与RASAL1的表达下降有关。

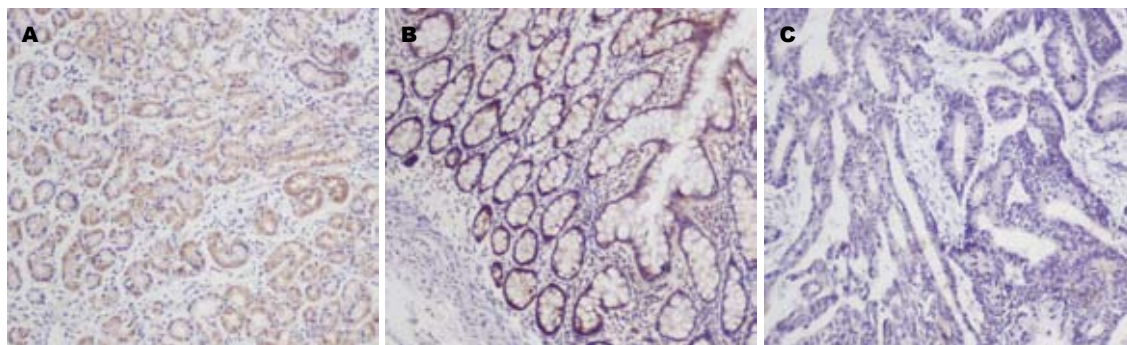


图1 结肠不同组织中RASAL1蛋白的表达(SP染色×100). A: 正常组织中(+++); B: 癌旁组织(+); C: 肠癌组织(-).

Tap酶2 U, cDNA模板5 μ L, 加dH₂O至反应体系为25 μ L. PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性2 min, 然后按94 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min, 重复35个循环, 最后72 $^{\circ}$ C 延伸10 min, 反应结束后, 扩增产物8 μ L+溴酚蓝指示剂2 μ L, 点样于2%琼脂糖凝胶(1 g琼脂糖+50 mL 0.5 \times TBE缓冲液, 煮沸, 加溴化乙锭2 μ L), 80 V电压, 电泳30 min, 用凝胶成像系统检测PCR产物特异性, 并进行条带灰度值分析, 目的带的灰度值与内参对照带相比, 比值>80%定为阳性。

统计学处理 采用统计学软件包SAS9.1及SPSS13.0进行; 采用Wilcoxon秩和检验、 χ^2 检验和Kruskal-Wallis H秩和检验分别对两样本及多样本阳性表达情况进行比较; 相关性检验采用Spearman等级相关分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测结果 RASAL1蛋白主要在细胞质内表达(图1), RASAL1蛋白在正常组织、癌旁组织、癌组织中的阳性表达率分别为96%(48/50)、85%(17/20)、46%(23/50), 表达的阳性率逐渐降低, 差异有统计学意义(均 $P<0.05$, 表1)。

2.2 结肠腺癌中RASAL1蛋白的表达与临床病理资料的关系 本组50例结肠癌中RASAL1蛋白表达与患者肿瘤分化程度、侵袭深度、淋巴结转移、TNM分期呈负相关($P<0.05$), 与患者性别、年龄及肿瘤大小间差异均无显著性(表2)。

2.3 RT-PCR检测结果 RASAL1 mRNA在正常组织、癌旁组织及癌组织中的阳性表达率分别为95%(19/20)、90%(18/20)、50%(10/20), 表达的阳性率逐渐降低, 差异有统计学意义(图2, 表3)。

2.4 RASAL1蛋白与mRNA表达的相关性 20例新鲜标本的3种不同组织中RASAL1蛋白及mRNA

表1 RASAL1蛋白在不同结肠组织中的表达(n)

病理类型	n	RASAL1蛋白表达			
		-	+	++	+++
正常组织	50	2	4	7	37
癌旁组织	20 ^a	3	4	5	8
癌组织	50 ^{bc}	27	12	9	2

Kruskal-Wallis H检验结果: $\chi^2 = 57.998$, $P<0.05$, 而后对3组进行混合编秩, 进行方差分析的Isd检验^[5]: ^a $P<0.05$ vs 正常组织; ^c $P<0.05$ vs 癌旁组织。

的表达不同, Spearman等级相关性分析结果显示, RASAL1蛋白及mRNA的表达明显正相关($r = 0.686$, $P<0.01$, 表4)。

3 讨论

肿瘤是人类死亡的第二大原因, 因此对于肿瘤的研究一直为学者们所热衷。既往研究多将重点放在抑癌基因及癌基因本身, 对于其调控蛋白及基因的研究很少; 而RASAL1作为新发现的Ras GAPs, 因参与Ras蛋白活化状态的调控而越来越受到关注。事实上, RASAL1已经通过RNAi筛选被确认为候选抑癌基因^[6], RASAL1的编码基因位于第12号染色体(12q24.13)^[1,7], 其结构中含有外显子1、2(Exon1, 2), PITX1结合位点, 甲基化位点等结构区。PITX1目前已被证实为抑癌基因, 在多种肿瘤细胞或组织中发现PITX1基因表达下调^[1,8]。已有研究证明, RASAL1作为抑癌基因PITX1基因的转录靶点, 参与了PITX1抑制Ras基因的作用过程^[9]。

RASAL1具有Ras GAPs家族特征性的结构, 可调控Ras蛋白的活性。Ras蛋白有活化和失活两种状态, 当其与GTP结合(Ras-GTP), 形成活化状态(开), 与GDP结合(Ras-GDP), 即为失活状态(关), 这种“开关”分别由GTP酶活化蛋白(GT-

表 2 50例结肠癌组织中RASAL1蛋白表达情况与患者临床病理资料的比较

病理资料	n	RASAL1蛋白表达(n)				W	P值
		-	+	++	+++		
性别							
男	29	15	9	4	1	737.0	0.957
女	21	12	3	5	1		
年龄(岁)							
<69	23	10	7	5	1	631.0	0.217
≥70	27	17	5	4	1		
肿瘤大小(cm)							
<4	28	14	6	7	1	520.5	0.383
≥4	22	13	6	2	1		
分化程度							
中高	20	7	7	4	2	667.5	0.033
低	30	20	5	5	0		
侵袭深度							
T1, T2	21	4	10	6	1	570.5	0.000
T3, T4	29	23	2	3	1		
淋巴结转移							
无	15	5	3	7	0	769.5	0.025
有	35	22	9	2	2		
TNM分期							
1, 2	27	10	10	5	2	426.0	0.044
3, 4	23	17	2	4	0		

■应用要点

本文检测了RASAL1在正常结肠组织、癌旁组织及癌组织中的表达情况, 并分析其与结肠癌临床病理特征的关系, 为癌基因调控蛋白在肠癌发生发展中的作用提供理论依据, 并为结肠癌的诊断及治疗提供了新的思路。

表 3 在不同结肠组织中RASAL1 mRNA的表达 (n = 20)

病理类型	RASAL1 mRNA	
	-	+
正常组织	1 ^a	19 ^a
癌旁组织	2 ^a	18 ^a
癌组织	10	10

3组卡方检验($\alpha = 0.05$), $\chi^2 = 14.337$, $P < 0.001$, 再进行两两比较(卡方检验), 经过校正后的 $\alpha = 0.0125$: ^a $P < 0.05$ vs 癌组织。

表 4 20例新鲜结直肠标本3种不同组织的RASAL1蛋白及mRNA表达的相关性 (n)

RASAL1蛋白	RASAL1 mRNA	
	-	+
-	12	7
+	1	40

Pase activating protein, GAP)和鸟苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factor, GEF)两种调节蛋白决定^[1]。GEF作用于Ras-GDP将Ras蛋白游离出来, Ras再与GTP结合从而将其激活; 存在于正常细胞中的GAP, 主要作用是激活Ras蛋白

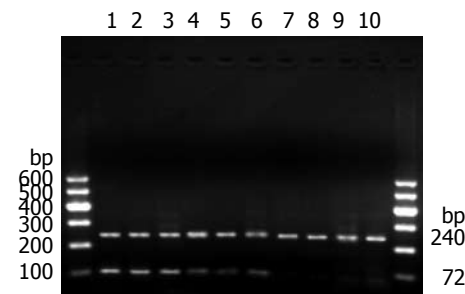


图 2 结肠不同组织中RASAL1 mRNA的表达。两侧为Mark-er(100 bp DNA ladder); 1-3: 正常组织; 4-6: 癌旁组织; 7-10: 癌组织。

的GTP酶, 从而将结合在Ras蛋白上的GTP水解成GDP, 成为失活型的蛋白。若Ras蛋白持续处于活化状态, 可与下游的效应蛋白结合, 将信号传递到下游信号元件, 可能引起细胞的异常增殖, 导致肿瘤的发生。目前已有Jin等^[1]发现RASAL1在心脏、肾脏、胃肠道等多达23种正常组织中均有表达, 其中以甲状腺及肾上腺髓质表达最多; 同时, RASAL1在头颈部鳞状细胞癌、口腔鳞状细胞癌、膀胱癌、黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、结肠癌细胞株中都有明显减少^[1-3]。另外Ohta等^[2]发现随着细胞从早期结肠腺瘤到腺癌, RASAL1的表达呈下降趋势。这一发现可能提

■同行评价

本文设计合理, 结果可靠, 为治疗结肠癌提供一定的实验基础。

示, RASAL1表达下降可能与肿瘤的发生发展有关。再者, 在野生型K-ras/BRAF结肠癌细胞株, 通过诱导RASAL1的过表达, 可降低表皮生长因子激活的MAPK级联反应中Ras下游的信号传导分子MEK1/2和ERK1/2磷酸化, 即表示RASAL1表达增多可能是通过这一信号途径抑制肿瘤生长^[2,3]。

目前发现有多种机制参与了RASAL1表达的下调, 包括: (1)启动子的甲基化: Ohta等^[2]在对于结直肠癌的研究中发现RASAL1存在启动子甲基化现象, 尤其是在野生型Ras活性增高的肿瘤细胞中。通过5-阿扎胞苷的去甲基化作用, RASAL1可恢复表达。研究认为, RASAL1基因甲基化后基因的功能被静默, 从而使Ras GTP酶活性减弱, 继而Ras-GTP灭活减少, Ras活性上调, 促使肿瘤的发生发展^[1-3]; (2)PITX1基因的调控异常: PITX1是新近通过RNA干扰文库技术发现的抑癌基因。RASAL1基因是PITX1的转录靶点, 可随着PITX1基因表达下调, 引起RASAL1基因表达的继发下调^[9], 继而野生型Ras活性增高, Ras过度表达, 因而导致多种肿瘤的发生发展。这一机制已在泌尿系及结肠肿瘤细胞株中得到证实^[1,10]。上述两种机制是通过导致RASAL1基因表达下降, 以致Ras GTP酶活性下降, Ras活性状态持续存在, 此为基因水平的调节, 而在蛋白水平, 存在钙偶联震荡调控: 即在RASAL1活化Ras的过程中, 则受到 $[Ca^{2+}]_i$ (胞内钙离子浓度)的调控。RASAL1是存在于胞质内的游离蛋白, 仅在黏附于质膜时才可发挥GTP的作用。一般RASAL1并不黏附于质膜。其分子结构中特征性的串联C2区域与磷脂有较强的亲和力, 但仅此并不足以使RASAL1蛋白黏附于质膜。Simon等研究证实, C2区域与质膜的黏附需通过钙离子诱导。只有在 $[Ca^{2+}]_i$ 峰值出现后, RASAL1才能与质膜相黏附。研究也观察到, 使用激动剂使质膜呈多态震荡时, 引起反复发生的胞内钙离子浓度的震荡, 与此同时, 可以检测到RASAL1在向质膜转移的过程。但RASAL1蛋白通过C2区域连接质膜的过程是短暂的, 此过程的长短受钙震荡频率的影响。钙震荡的频率越高, RASAL1蛋白的亲和力越好^[1,9,11-15]。正常状态下, RASAL1可通过钙离子介导的这一过程黏附于质膜, 激活Ras GTP酶, 使与Ras结合的GTP转化为GDP, 继而导致Ras失活, 从而抑制肿瘤的发生发展。而当这一过程受阻时, 则出现Ras的持续活化, 进一步激活下游的信号, 促进细胞增生、分化, 引

起肿瘤的发生。

关于结肠腺癌组织中RASAL1的表达情况, 目前国内尚未见报道。本研究发现, 50例正常组织RASAL1阳性表达率为96%, 此结果与Jin等^[1]对于正常组织中RASAL1表达情况的检测结果基本一致。结肠腺癌中的RASAL1 mRNA、蛋白阳性表达率分别为50%(10/20)、46%(23/50)明显低于癌旁组织及正常组织, 此趋势与Ohta等^[2]的研究相同。在正常组织、癌旁组织中RASAL1蛋白、mRNA的表达呈递减趋势。RASAL1蛋白及mRNA的表达明显正相关, 但前者的阳性率略高于后者, 可能跟检测方法不同、RT-PCR检测敏感性更高有关, 也可能与mRNA翻译成蛋白质的过程中出现信号的缩小及翻译后蛋白质的稳定性有关。另有文献报道^[2,3]: 在结肠癌组织中, RASAL1的过表达能导致野生型K-ras的失活, 即RASAL1的表达只与野生型的Ras相关, 亦仅能抑制野生型Ras的活化, 与突变型的Ras关系不密切, 这可能会导致某些具有突变型K-ras的RASAL1基因, 其RASAL1表达不下调。而免疫组织化学及RT-PCR均不能检测出K-ras的突变情况, 因而无法得知其与RASAL1的相关性, 在今后的研究中将进一步关注。本实验研究显示随着患者肿瘤分化程度降低、侵袭深度增加、淋巴结转移增多、TNM分期增大, 肠癌中RASAL1的表达下调更明显($P<0.05$), 即RASAL1的表达与患者临床分期、疾病进展呈负相关, 而与患者性别、年龄及肿瘤大小间差异均无显著性, 说明RASAL1在结肠癌的发生发展中起着重要作用, 为结肠癌预后的评估提供了新的思路, 但这与Ohta等^[2]的报道不完全一致, 可能与取材及病例例数有关。

总之, RASAL1蛋白及 mRNA在结肠癌中的低表达, 可能与调节肿瘤的生长和增殖的细胞信号通路有关, 这方面仍需作进一步的研究, 希望RASAL1或能作为结肠癌治疗的新靶点。

4 参考文献

- 1 Jin H, Wang X, Ying J, Wong AH, Cui Y, Srivastava G, Shen ZY, Li EM, Zhang Q, Jin J, Kupzig S, Chan AT, Cullen PJ, Tao Q. Epigenetic silencing of a Ca(2+)-regulated Ras GTPase-activating protein RASAL defines a new mechanism of Ras activation in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 12353-12358
- 2 Ohta M, Seto M, Ijichi H, Miyabayashi K, Kudo Y, Mohri D, Asaoka Y, Tada M, Tanaka Y, Ikenoue T, Kanai F, Kawabe T, Omata M. Decreased expression of the RAS-GTPase activating protein RASAL1 is associated with colorectal tumor progression.

- Gastroenterology* 2009; 136: 206-216
- 3 Bernards A, Settleman J. Loss of the Ras regulator RASAL1: another route to Ras activation in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2009; 136: 46-48
 - 4 Fromowitz FB, Viola MV, Chao S, Oravez S, Mishriki Y, Finkel G, Grimson R, Lundy J. ras p21 expression in the progression of breast cancer. *Hum Pathol* 1987; 18: 1268-1275
 - 5 丁元林, 孔丹莉. 多个样本及其两两比较的秩和检验 SAS程序. *中国卫生统计* 2002; 19: 313-314
 - 6 Westbrook TF, Martin ES, Schlabach MR, Leng Y, Liang AC, Feng B, Zhao JJ, Roberts TM, Mandel G, Hannon GJ, Depinho RA, Chin L, Elledge SJ. A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST. *Cell* 2005; 121: 837-848
 - 7 Allen M, Chu S, Brill S, Stotler C, Buckler A. Restricted tissue expression pattern of a novel human rasGAP-related gene and its murine ortholog. *Gene* 1998; 218: 17-25
 - 8 Chen Y, Knösel T, Ye F, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Petersen I. Decreased PITX1 homeobox gene expression in human lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 55: 287-294
 - 9 Kolfschoten IG, van Leeuwen B, Berns K, Mullenders J, Beijersbergen RL, Bernards R, Voorhoeve PM, Agami R. A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell* 2005; 121: 849-858
 - 10 Muallem S. Decoding Ca²⁺ signals: a question of timing. *J Cell Biol* 2005; 170: 173-175
 - 11 Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, Pandit B, Oishi K, Martinelli S, Schackwitz W, Ustaszewska A, Martin J, Bristow J, Carta C, Lepri F, Neri C, Vasta I, Gibson K, Curry CJ, Siguero JP, Digilio MC, Zampino G, Dallapiccola B, Bar-Sagi D, Gelb BD. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007; 39: 75-79
 - 12 Liu Q, Walker SA, Gao D, Taylor JA, Dai YF, Arkell RS, Bootman MD, Roderick HL, Cullen PJ, Lockyer PJ. CAPRI and RASAL impose different modes of information processing on Ras due to contrasting temporal filtering of Ca²⁺. *J Cell Biol* 2005; 170: 183-190
 - 13 Walker SA, Kupzig S, Bouyoucef D, Davies LC, Tsuboi T, Bivona TG, Cozier GE, Lockyer PJ, Buckler A, Rutter GA, Allen MJ, Philips MR, Cullen PJ. Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca²⁺ oscillations. *EMBO J* 2004; 23: 1749-1760
 - 14 Kupzig S, Walker SA, Cullen PJ. The frequencies of calcium oscillations are optimized for efficient calcium-mediated activation of Ras and the ERK/MAPK cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 7577-7582
 - 15 Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, Li L, Yassin Y, Tamburino AM, Neel BG, Kucherlapati RS. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007; 39: 70-74

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR 6 本期刊 被 PMC 收录

本刊讯 我们于2010-08-17收到PubMed Central(PMC)的通知, 经过美国国立医学图书馆机构咨询委员会The Literature Selection Technical Review Committee评定, 决定*WJC, WJGE, WJGO, WJGS, WJH, WJR* 6本期刊被PMC收录. PMC是一个提供生命科学期刊文献的全文数据库, 他是由隶属美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)所创建与管理的.(常务副总编辑: 张海宁 2010-08-17)

肥大细胞与肠易激综合征关系的研究进展

霍涛, 胡团敏

■背景资料

肠易激综合征 (IBS)最早由Powell于1820年报道,是临床上最常见的胃肠功能紊乱性疾病之一,世界各国均有发病,且发病率高,患者以中青年居多,其特征为持续或间歇性发作的腹痛、腹胀、排便习惯改变和大便形状改变。由于其病因和发病机制尚未完全清楚,诊断主要依靠症状学和排除器质性疾病。

霍涛, 胡团敏, 中国人民解放军第180医院消化内科 福建省泉州市 362000
南京军区“十一五”医药卫生科研基金资助项目, No. 08MA075

作者贡献分布: 胡团敏与霍涛共同完成论文的选题; 霍涛完成文献的检索及论文撰写; 胡团敏负责论文的审核和修改。

通讯作者: 胡团敏, 教授, 主任医师, 362000, 福建省泉州市, 中国人民解放军第180医院消化内科. yihu180@yahoo.com.cn
电话: 0595-28919151

收稿日期: 2010-11-29 修回日期: 2011-01-19

接受日期: 2011-01-20 在线出版日期: 2011-02-18

Advances in understanding the relationship between mast cells and irritable bowel syndrome

Tao Huo, Tuan-Min Hu

Tao Huo, Tuan-Min Hu, Department of Gastroenterology, the 180th Hospital of Chinese PLA, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Supported by: the 11th Five-year the Medical and Scientific Research Fund of Nanjing Military Command of Chinese PLA during the 11th Five-year Period, No. 08MA075

Correspondence to: Professor Tuan-Min Hu, Department of Gastroenterology, the 180th Hospital of Chinese PLA, Quanzhou 362000, Fujian Province, China. yihu180@yahoo.com.cn

Received: 2010-11-29 Revised: 2011-01-19

Accepted: 2011-01-20 Published online: 2011-02-18

Abstract

The pathogenesis of irritable bowel syndrome (IBS) is very complicated. At present, it is generally believed that IBS is related to infection and inflammation, visceral hypersensitivity, gastrointestinal neuro-endocrine-immune dysfunction, psychological stress, intestinal food allergy, and other factors. Recently, attention has been directed to the role of low inflammation in the pathogenesis of IBS, especially the relationship between mast cells and IBS. Numerous studies have shown that the development of IBS involves abnormal alterations of mast cells. Mast cell degranulation leads to the release of many bioactive mediators that participate in the pathophysiological process of IBS. Abnormal alterations of mast cells in IBS are related not only to intestinal low-grade inflammation but also to other pathogenic factors.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Mast cells; Degranulation

Huo T, Hu TM. Advances in understanding the relationship between mast cells and irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 494-497

摘要

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的发病机制复杂,目前普遍认为IBS与感染和炎症、内脏高敏、肠道局部神经-内分泌-免疫系统紊乱、心理压力及肠道食物过敏等多因素有关。近年来IBS的低度炎症更是关注的热点,尤其是肥大细胞与IBS的关系探讨。多项研究结果表明IBS肠道肥大细胞的数量及表达存在异常,且肥大细胞脱颗粒释放的多种生物活性介质参与了IBS的病理生理过程。本文综述了IBS肠道肥大细胞异常的数量及其表达不仅与肠低度炎症有关而且与其他发病因素密切相关。

关键词: 肠易激综合征; 肥大细胞; 脱颗粒

霍涛, 胡团敏. 肥大细胞与肠易激综合征关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 494-497

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/494.asp>

0 引言

肥大细胞是一种能贮存和分泌多种介质的免疫细胞,在肠道中作为一种抗原感受器,参与了肠黏膜的局部免疫。肥大细胞内含有特定的胞质颗粒,其中贮存有炎性介质,当遇到各种理化因素或内源性物质的刺激时产生脱颗粒作用,并释放多种生物活性介质如组胺、5-羟色胺、前列腺素、白三烯、血小板活化因子和细胞因子等,这些介质可引起感觉神经末梢兴奋以及发挥信号传递等各种作用。越来越多的研究表明,肥大细胞在肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)的发病过程中起到了重要作用,IBS患者的肠黏膜中的肥大细胞存在异常^[1-6],抑制了肥大细胞脱颗粒就可以减轻IBS的临床症状,因此对肥大细胞更加深入的认识愈发显得重要。

■同行评议者

王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

本文就肥大细胞与IBS关系的研究进展综述如下。

1 肥大细胞数目的改变与活化

国外学者Weston等^[1]早在1993年报道过IBS患者回肠末端黏膜固有层肥大细胞数目增多, 人们逐渐认识到肥大细胞的改变在IBS中可能起到重要作用, 对于IBS中肥大细胞的研究也越来越多。1997年杨云生等^[2]分别对IBS患者及对照组进行回盲部肥大细胞计数, 其结果比较, 发现IBS组回盲部肥大细胞计数明显增多, 与Weston等的研究结果相类似。2003年王伟岸等^[3]研究报道IBS患者直肠乙状结肠交界处黏膜肥大细胞数增多, 且肥大细胞活化比率明显增高, 肥大细胞活化的数目与症状严重程度之间呈成正相关。2007年Guilarte等^[4]对20例腹泻型IBS患者的研究发现IBS患者空肠黏膜肥大细胞数目也明显高于正常对照组, 指出IBS患者黏膜炎症指标不仅局限在低位肠道, 高位肠道的肥大细胞增多也介导了炎症的产生。2008年Lee等^[5]在对不同分型的IBS患者直肠活组织标本研究中发现, 感染后和非感染后腹泻型IBS肥大细胞均明显增多, 而先前没有感染史的便秘型和腹泻便秘交替型IBS患者, 直肠黏膜肥大细胞并没有明显增多。通过以上研究我们可以发现, 肥大细胞的异常可能导致IBS症状的发生, 并且与IBS的亚型和肠道的部位有一定的关系。

2 肥大细胞与感染及炎症的关系

近些年来, 越来越多的学者报道IBS与肠道感染和炎症相关^[7-9], 大约有30%患者在患IBS之前有急性肠炎的病史^[10]。Neal等^[11]对544例急性胃炎患者进行随访观察, 发现感染后6 mo肠功能紊乱的发生率为25%, 高于对照组。部分被肠道病毒、细菌或寄生虫感染的患者, 在病原体已经消除及黏膜炎症消退后, 可发生IBS的症状, 对此称之为感染后IBS(post-infective IBS, PI-IBS)。自PI-IBS的概念提出后, 现在已被大多数学者所接受, 有研究表明, PI-IBS患者肠黏膜肥大细胞增多更明显^[12-14]。由于肠道感染和炎症激活了肥大细胞, 促使其释放了组胺、前列腺素、五羟色胺、白三烯等引发肠道的高敏状态^[15,16], 产生了一系列胃肠道不适症状。

然而尚有研究表明仅有1/3的IBS患者有急性肠道感染史, 而另外2/3无急性肠道感染史的IBS患者亦表现肥大细胞增多, 考虑与其他因素有关。尤其值得重视的是肠道内, 特别是大肠内存在的大量微生物, 由于肠黏膜有丰富的淋巴

组织, 这些微生物不断刺激淋巴细胞使之活化, 有学者称之为生理性炎症。尚有研究表明IBS患者小肠内存在细菌过度增长现象^[17,18], Peralta等^[19]对97例IBS患者进行了乳果糖呼气试验(breath test with lactulose, BTLact), 阳性率55.6%, 表明小肠内细菌过度增长, 经过对BTLact阳性的患者用利福昔明治疗3 wk后, 约50%转阴, 且相关症状也明显减轻, 提示小肠内细菌的过度增长也可能是IBS致病的一个危险因素, 至于小肠内细菌过度增长与肠黏膜肥大细胞增多之间的相关性, 尚有待于进一步研究论证。总之, 肠道内各种复杂繁多的微生物的长期持续性刺激可能是导致IBS患者肠黏膜肥大细胞增多和活化的一个重要原因。

3 肥大细胞与内脏高敏及肠道局部神经-内分泌-免疫系统的关系

肥大细胞是神经免疫轴的固有成分, 电镜下可见肥大细胞与含神经肽P物质和降钙类基因相关肽等感觉神经纤维密切相连, 而这些神经肽参与疼痛的病理生理过程, 并诱发肥大细胞脱颗粒^[20], 因此, 推测肥大细胞与IBS的内脏高敏状态关系密切, Park等^[21]证实了在腹泻型IBS患者中, 在一定范围内肥大细胞的数目与内脏敏感程度成正相关。王利华等^[22]研究也发现IBS组和对照组患者肠黏膜内多数肥大细胞与神经纤维紧邻, 且IBS组肠黏膜内肥大细胞数量增多及其周围神经肽(神经元特异性烯醇化酶、P物质、降钙素基因相关肽、五羟色胺)表达增强。多项研究已表明IBS是肠道局部神经-内分泌-免疫系统紊乱导致的肠道动力性疾病, 而肥大细胞是这个复杂体系中的一个重要节点, 起到信息调控的作用。肠道激活状态的肥大细胞可能在IBS中所表现的以动力改变、感觉异常为特征的内脏高敏感性的病理生理过程中起到关键性作用; 肥大细胞将刺激的免疫反应信息传达到神经系统, 并接受神经系统的调控, 反馈靶器官产生免疫应答^[22,23]。

4 肥大细胞与心理压力的关系

心理因素一直被人们认为是IBS的一种发病因素, 在IBS的发病中不容忽视。近年来Guilarte等^[4]研究发现腹泻型IBS患者表现更高的心理压力, 同时伴有空肠黏膜显示肥大细胞数目显著增加, 空肠液里发现肥大细胞活化的标志物类胰蛋白酶含量明显高于健康对照组, 提出IBS是一种伴有空肠黏膜肥大细胞增殖活化的心理压力相

■研发前沿

越来越多的观点支持IBS肠道存在低度炎症, 而肥大细胞与IBS之间的联系逐渐成为研究的热点之一。

■相关报道

Peralta等在对97例IBS患者进行乳果糖呼气试验中发现, 约55.6% IBS患者存在小肠内细菌过度增长现象, 小肠内细菌过度增长可能是IBS致病的一个危险因素。

■应用要点

IBS发病机制复杂,为临床治疗带来一定困难,现多采用对症治疗等措施,治疗效果欠佳,随着人们对肥大细胞在IBS发病中发挥作用更为深入的认识,各种新型肥大细胞稳定剂等相关制剂的研制开发可能成为缓解IBS症状的有效药物。

关的肠功能紊乱疾病。最近Kim等^[24]报道,在心理压力介导下,大鼠结肠黏膜肥大细胞数目显著高于无压力组,促肾上腺皮质激素释放因子(corticotrophin-releasing factor, CRF)拮抗剂处理组肥大细胞数目明显低于生理盐水处理组,提出压力可通过改变CRF的表达,进而影响肥大细胞数目。人们已发现IBS患者肠神经纤维与活化的肥大细胞紧密毗邻^[25],是否是中枢致敏,焦虑等不良情绪通过神经纤维将信号传导至肥大细胞引起脱颗粒进而引起IBS症状,这种假设可以解释IBS与心理压力的关系^[26],但需要更多的研究来论证。

5 肥大细胞与肠道食物过敏的关系

临床工作中,我们发现进食某些特定食物可诱发或加重IBS症状,食物过敏可能是IBS的机制之一。目前有关IBS患者血清食物特异性抗体IgE和IgG的研究,国内鲜见报道,国外有少量报道,结论也并不一致,食物过敏导致IBS尚存在争议。Shanahan等^[27]报道IgG介导的食物迟发过敏反应在IBS中有重要作用,杨崇美等^[28]研究发现腹泻型IBS IgE和IgG抗体阳性率均高于健康对照组,便秘型IBS IgG抗体阳性率高于健康对照组,食物诱导的腹泻型IBS与便秘型IBS发病机制可能存在差异。IgE介导的是速发型过敏反应,主要是通过肥大细胞膜表面的IgE受体交联,导致肥大细胞脱颗粒,表现出一系列临床症状,已在体内外实验中得到证实^[26,29]。IgG介导的食物过敏反应由多种食物引发,症状比较隐密,一般在过敏食物摄入24 h至几天后发作,患者对症状与饮食的关系难以做出判断。在由食物诱发的IBS中,肥大细胞所产生的效应,是否腹泻型IBS大于便秘型IBS,尚需进一步研究。

6 结论

肥大细胞在IBS患者肠黏膜中数量及表达的异常,为人们研究IBS的发病机制提供了一个新的切入点。肥大细胞在IBS发病中的作用,主要是通过脱颗粒产生的多种生物介质参与了各项发病机制的调控。然而,目前各种新型肥大细胞稳定剂的研制开发将为缓解IBS症状提供有效的治疗药物^[30,31]。随着电镜技术和分子生物化学的发展,对肥大细胞形态学和释放的活性介质的研究已取得了一定进展,但是肥大细胞中含有的生物介质种类繁多,产生的生物学效应也不尽相同,因此对人们的研究工作提出了更高的

要求。尤其是肥大细胞与精神-神经-内分泌-免疫系统的联系将是我们以后研究的重点和难点。

7 参考文献

- Weston AP, Biddle WL, Bhatia PS, Miner PB Jr. Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 1590-1595
- 杨云生, 周殿元, 张万岱, 张振书, 宋于刚. 肠易激综合征回盲部肥大细胞的研究. *中华内科杂志* 1997; 36: 231-233
- 王伟岸, 钱家鸣, 潘国宗. 结肠黏膜肥大细胞活化在肠易激综合征发病中的作用. *中华消化杂志* 2003; 23: 263-266
- Guilarte M, Santos J, de Torres I, Alonso C, Vicario M, Ramos L, Martínez C, Casellas F, Saperas E, Malagelada JR. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut* 2007; 56: 203-209
- Lee KJ, Kim YB, Kim JH, Kwon HC, Kim DK, Cho SW. The alteration of enterochromaffin cell, mast cell, and lamina propria T lymphocyte numbers in irritable bowel syndrome and its relationship with psychological factors. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1689-1694
- 王承党, 郭朝书. 肥大细胞和类胰蛋白酶在腹泻型肠易激综合征升结肠黏膜中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 1682-1686
- Gwee KA, Collins SM, Read NW, Rajnakova A, Deng Y, Graham JC, McKendrick MW, Mouchhala SM. Increased rectal mucosal expression of interleukin 1beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome. *Gut* 2003; 52: 523-526
- Minderhoud IM, Oldenburg B, Wismeijer JA, van Berge Henegouwen GP, Smout AJ. IBS-like symptoms in patients with inflammatory bowel disease in remission; relationships with quality of life and coping behavior. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 469-474
- Ji S, Park H, Lee D, Song YK, Choi JP, Lee SI. Post-infectious irritable bowel syndrome in patients with Shigella infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 381-386
- 任建林, 焦兴元. 现代消化病诊疗学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2007: 272-276
- Neal KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *BMJ* 1997; 314: 779-782
- Bercik P, Verdu EF, Collins SM. Is irritable bowel syndrome a low-grade inflammatory bowel disease? *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 235-245, vi-vii
- Spiller RC. Inflammation as a basis for functional GI disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 641-661
- Kim HS, Lim JH, Park H, Lee SI. Increased immunoendocrine cells in intestinal mucosa of postinfectious irritable bowel syndrome patients 3 years after acute Shigella infection--an observation in a small case control study. *Yonsei Med J* 2010; 51: 45-51
- Farhadi A, Fields JZ, Keshavarzian A. Mucosal mast cells are pivotal elements in inflammatory bowel disease that connect the dots: stress, intestinal hyperpermeability and inflammation. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3027-3030
- Ohman L, Simrén M. Pathogenesis of IBS: role of in-

- flammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 163-173
- 17 Posserud I, Stotzer PO, Björnsson ES, Abrahamsson H, Simrén M. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2007; 56: 802-808
 - 18 Vanner S. The small intestinal bacterial overgrowth. Irritable bowel syndrome hypothesis: implications for treatment. *Gut* 2008; 57: 1315-1321
 - 19 Peralta S, Cottone C, Doveri T, Almasio PL, Craxi A. Small intestine bacterial overgrowth and irritable bowel syndrome-related symptoms: experience with Rifaximin. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2628-2631
 - 20 Gui XY. Mast cells: a possible link between psychological stress, enteric infection, food allergy and gut hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: 980-989
 - 21 Park JH, Rhee PL, Kim HS, Lee JH, Kim YH, Kim JJ, Rhee JC. Mucosal mast cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 71-78
 - 22 王利华, 方秀才, 潘国宗. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞与神经纤维的关联. *中华消化杂志* 2003; 23: 332-335
 - 23 董文珠, 李兆申, 邹多武, 许国铭, 邹晓平, 朱爱勇, 尹宁, 龚艳芳. 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞与P物质的相关性. *中华内科杂志* 2003; 42: 611-614
 - 24 Kim DH, Cho YJ, Kim JH, Kim YB, Lee KJ. Stress-induced alterations in mast cell numbers and proteinase-activated receptor-2 expression of the colon: role of corticotrophin-releasing factor. *J Korean Med Sci* 2010; 25: 1330-1335
 - 25 Park CH, Joo YE, Choi SK, Rew JS, Kim SJ, Lee MC. Activated mast cells infiltrate in close proximity to enteric nerves in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 204-210
 - 26 Addolorato G, Gasbarrini G, Marsigli L, Stefanini GF. Irritable bowel syndrome and food allergy: an association via anxiety-depression? *Gastroenterology* 1996; 111: 833-834
 - 27 Shanahan F, Whorwell PJ. IgG-mediated food intolerance in irritable bowel syndrome: a real phenomenon or an epiphenomenon? *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1558-1559
 - 28 杨崇美, 李延青. 肠易激综合征患者食物特异性抗体IgE和IgG的检测. *中华消化内镜杂志* 2007; 24: 346-349
 - 29 Oliver MR, Tan DT, Scott RB. Colonic motor response to IgE-mediated mast cell degranulation in the Hooded-Lister rat. *Neurogastroenterol Motil* 1996; 8: 121-130
 - 30 Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Corinaldesi R. Functional gastrointestinal disorders and mast cells: implications for therapy. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 6-17
 - 31 Klooker TK, Braak B, Koopman KE, Welting O, Wouters MM, van der Heide S, Schemann M, Bischoff SC, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2010; 59: 1213-1221

■同行评价

本文内容全面, 有助于IBS的临床诊断与治疗。

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种。本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

溃疡性结肠炎患者生存质量研究现状与展望

刘凤斌, 李筱颖

■背景资料

溃疡性结肠炎属于炎症性肠病一种, 由于其病程迁延难愈, 长期使用药物使患者不仅生理上需要承受疾病带来的损害, 而且心理、社会等领域也会受到严重影响。因此, 对溃疡性结肠炎患者生存质量状况作出探讨, 有利于发现影响该病患者疾病治疗以及日常生活最主要的方方面面, 从而促使临床医师更进一步优化治疗方案, 促进医疗社会机构对该病患者社会保障等的关注。

刘凤斌, 广州中医药大学第一附属医院二内科 广东省广州市 510405

李筱颖, 广州中医药大学第一临床医学院 广东省广州市 510405

国家自然科学基金资助项目, No. 81073163

作者贡献分布: 本文综述由刘凤斌与李筱颖共同完成。

通讯作者: 李筱颖, 主治医师, 510405, 广东省广州市, 广州中医药大学第一临床医学院. veinlix@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-11-16 修回日期: 2011-01-10

接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-18

Research of the quality of life of patients with ulcerative colitis: current status and future prospects

Feng-Bin Liu, Xiao-Ying Li

Feng-Bin Liu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Xiao-Ying Li, the First Clinical Medical College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 81073163

Correspondence to: Xiao-Ying Li, the First Clinical Medical College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. veinlix@yahoo.com.cn

Received: 2010-11-16 Revised: 2011-01-10

Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-18

Abstract

Since there is a currently increasing incidence of ulcerative colitis (UC) in China, the research of the quality of life (QOL) of UC patients is of great significance. UC influences many aspects of patients' QOL, including physical functions, psychological functions, social relationship, and emotional functions. There are generic and specific instruments available for the estimation of the QOL of UC patients, and the combination of them can be more informative. Compared to abundant findings obtained in developed countries, the research of the QOL of UC patients is still in infancy stage in China. Therefore, it is essential to conduct extensive research of the QOL of UC patients to improve the efficacy of possible interventions.

■同行评议者

崔莲花, 副教授, 青岛大学医学院公共卫生系

Key Words: Quality of life; Ulcerative colitis; Inflammatory bowel disease

Liu FB, Li XY. Research of the quality of life of patients with ulcerative colitis: current status and future prospects. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 498-504

摘要

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种, 其临床表现多样性, 病程迁延难愈, 患者不仅在生理功能方面受到影响, 而且在心理功能、社会关系、情感功能等领域中均有不同程度的下降。对UC患者生存质量(quality of life, QOL)进行评价, 可更全面地反映患者对不同治疗方案的真实感受, 有利于对临床疗效的评价及临床决策的制定。根据研究目的不同, 评价量表主要有普适性量表和疾病特异性量表, 两者结合使用可更全面地反映UC患者QOL情况。对比国外大量的研究结果, 国内UC患者生存质量研究仍处于起步阶段, 故应加强对UC患者的生存质量研究以提高综合干预效果。

关键词: 生存质量; 溃疡性结肠炎; 炎症性肠病

刘凤斌, 李筱颖. 溃疡性结肠炎患者生存质量研究现状与展望. *世界华人消化杂志* 2011; 19(5): 498-504

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/498.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是由不明原因的多种致病因素导致机体复杂性失调, 以缓解与恶化交替发作的消化道慢性炎症为主要特征的一种慢性疾病, 属于炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种。本病是一个全球性的疾病, 发病率以欧美国家为最高, 而亚非国家相对较低^[1]。从近年来流行病学资料看, 本病的发生率逐年增加, 尤以亚非国家为著。在亚洲, UC的年发病率为1.0/10万-2.0/10万^[1,2], 克罗恩病(Crohn's disease, CD)则为0.5/10万-1.0/10万^[2,3]。UC的患病率为4.0/10万-44.3/10万。CD为3.6/10万-7.7/10万^[4,5]。中国推测UC和CD的患病率分别

为11.6/10万和1.4/10万^[6]. UC较CD常见. 有研究提示中国UC患者和CD患者的平均诊断年龄为44.0岁和37.7岁^[7], 其发病具有一定的家族聚集性^[8]. 该病目前尚无特效的治疗方法, 主要通过姑息性的药物治疗、饮食调节、体育锻炼以期控制炎症, 严重者则采用手术治疗. 既往肠镜检查、疾病活动指数在评价UC严重程度方面发挥了重要作用, 但两者都仅考虑了疾病带来的生理、病理改变. 由于每一个体对疾病和治疗的反应以及对自身健康状况的评价和看法的不同, 疾病对患者造成的影响也会有所差异. 因此, 临床表现完全一样的两位患者对疾病治疗的反映可截然不同. 仅观察患者的生理指标, 容易产生疾病评价的片面性. 随着医学模式的转变, 单用实验室指标、缓解率和治愈率等描述患者的疗效和预后已经不能满足临床需要, 人们开始注重UC患者功能水平、心理状况、社会关系、经济负担、总体健康状况等方面的评价. 故临床治疗的最终目的是患者症状和体征的改善、生存质量的提高. 作为标准化和定量化测评生理和心理功能的工具, 生存质量(quality of life, QOL)量表和患者报告结局指标(patient reported outcomes, PRO)已成为UC临床试验中疗效评价的重要测评工具.

1 UC患者与其他人群QOL比较

作为IBD的一种, UC患者QOL既有慢性病患者的共同特点, 又在肠病领域有着其特异性.

1.1 UC患者QOL UC患者QOL比一般人群差^[9-11]. 除处理日常生活能力的躯体机能外, UC患者在SF-36量表中其他各领域得分比一般人群低. 两者QOL最明显的差异之处在于疾病人群和一般人群对整体健康状况的认知能力不同: 疾病人群认为他们更容易患病并预计他们的健康状况会变坏. 对UC患者进行疾病病程、轻重程度对比, 结果显示: 缓解期比轻症UC患者QOL好, 其中在心理健康、社会功能、精力等领域得分较高. 重症(患者)比轻症患者仅在精力和社会功能方面得分低, 且差异具有统计学意义^[9,12].

1.2 UC与CD患者QOL比较 使用SF-36对UC与CD患者QOL进行对比评价, 结果表明: UC比CD患者拥有更好的QOL, 尤其在大便失控、肿瘤发生、躯体疼痛领域QOL得分较高, 结果具有统计学意义. 在疾病缓解期的患者QOL得分比活动期高, 在UC患者得分中尤为明显^[9]. CD患者比UC患者表现出更严重的焦虑和沮丧, 而这个差异可

能由于患CD的患者更多严重的症状所致^[13].

1.3 UC与其他慢性病QOL比较 与其他慢性疾病对比, UC也显示出类似的QOL下降. 一项年龄相关的IBD患者和IBS患者的对比研究显示, 尽管两种疾病的严重性不一致, 但在两组中却存在类似的QOL下降情况^[14]. 另一研究表明, UC、食管反流病消化系溃疡患者均显示QOL有所下降, 但QOL得分下降的领域有所不同: 胃食管反流病患者和消化道溃疡患者在躯体疼痛方面的QOL得分明显下降, 而UC患者则在机体健康状况认知方面明显下降^[12]. 由于IBD多合并风湿病部分表现, 故有研究者对IBD、多发性硬化和风湿性关节炎患者的QOL对比, (结果)显示IBD患者QOL最好, 而多发性硬化患者QOL最差^[15]. 德国的一项针对UC、糖尿病、血友病、正接受治疗的肿瘤患者的研究显示出相类似的QOL状况. 然而, 帕金森病、艾滋病、抑郁症、焦虑症或进食障碍患者比UC患者QOL得分更低^[16]. 上述研究表明, 由于上述疾病的迁延难愈、反复发作, 患者在日常生活、心理、社会等方面受到不同程度的影响, 从而在QOL中具有类似的表现, 而此与疾病的严重程度未显示必然的相关性.

1.4 青少年患者和其家庭成员QOL研究 由于青少年所处社会地位、家庭角色等与成年人不同, 故UC对青少年患者QOL的影响与成年人不同, 主要表现在: 生理领域如关节疼痛; 或在疾病诊治过程中对内镜检查的肠道准备、鼻饲管的使用等疑惑和恐惧; 社会领域如患儿自觉缺乏教师同情支持、由于疾病和就诊致假期的减少而影响日常社会活动等^[17]. 同时, 由于患儿仍未具备独立行为能力, 故家庭成员在处理患儿疾病中发挥主要作用. 因此, QOL的下降不仅限于患儿, 还包括其家庭成员: 患儿家长和其他兄弟姐妹. 家长主要受到疾病对患儿生活影响的困扰, 如: 患儿的将来(工作、婚姻、独立能力)、在校遇到的问题、医疗不良反应、生活方式受限制、就业限制, 以及由此引起的负罪、内疚感等. 患儿兄弟姐妹QOL则主要受: 其父母对其隐瞒疾病信息、担心患儿在校受到欺负、对疾病及其治疗的恐惧、对父母过度保护患儿而产生的妒忌心理等影响^[18].

2 影响UC患者QOL的因素

UC对患者QOL的影响包括生理功能、社会功能、精力以及心理因素等. 生理改变包括疼痛、肠道出血、系统性炎症、腹泻、便秘、恶

■研发前沿

生存质量、患者报告结局指标是评价溃疡性结肠炎患者临床疗效的良好指标. 随着生存质量的发展, 已逐渐被美国食品药品监督管理局(FDA)正式规定任何医药制品的标签、说明书等必须有患者报告结局的证据支持. 标签、说明书上关于有效性和安全性的声明, 这也成为目前国内研究的热点.

■应用要点

本文为下阶段制定符合中国文化、有中医特色的溃疡性结肠炎量表,以及溃疡性结肠炎临床疗效评价体系的完善提供了一定的思路。

心、体质量下降和疲劳等。其中,肠道症状、风湿病症状为影响QOL的重要因素。此外,患者也常被对疾病相关知识的不熟悉、疾病进程、治疗方式、疗效等所困惑^[6]。

2.1 疾病的严重程度 疾病的严重程度是影响UC患者QOL的最重要因素。一项西班牙的多中心研究显示,随着患者病情的恶化、肠道症状的增多和加重,其QOL得分逐步下降。此外,具有肠外表现的患者也比无肠外表现的患者显示明显的QOL下降。同时,患者肠道病变部位、范围也会对其QOL有一定的影响^[19]。

2.2 病程进展和治疗方案 病程和治疗方案对UC患者的影响取决于病程的长短、方案的选择、治疗效果和不良反应。病程的长短、方案的选择、疗效和药物副作用也是影响UC患者QOL的重要因素。随着病程的延长,患者QOL的影响因素也有所差异:从最初单纯的肠道炎症症状对患者造成影响而逐渐进展为频繁的住院和就诊所带来的心理、生理影响和长期使用药物(如皮质类固醇)带来并发症所带来的QOL的改变^[20]。在治疗方案的选择上,影响患者QOL的治疗相关因素包括:疗效、不良反应以及治疗的简繁性、治疗费用等。研究显示,5-ASA、免疫调节剂等都能改善患者QOL。然而,由于5-ASA治疗方案中需要服用大量药物,导致的患者依从性降低,从而增加疾病突然发作的风险,也直接影响到患者QOL^[21-25]。使用免疫调节剂治疗的患者QOL有所提高,但难以确定这些提高是否与疾病的严重程度和治疗效果有关。使用皮质类固醇者QOL得分较低,且该低水平的QOL得分与疾病的活动性及严重程度有关。同时,众多的不良反应与皮质醇激素的使用均呈相关性,如:体质量增加、满月脸、痤疮、水肿等,此均会导致患者QOL的下降^[26]。而新一代免疫调节药物英夫利西能显著提高UC患者QOL得分,且维持治疗能使其QOL提高达1年之长;病情得到缓解的患者与正常人群有着类似的QOL得分^[27]。

手术是影响UC患者QOL的另一重要因素,其不仅表现为患者对手术的恐惧,还包括术式对患者的影响。回肠、直肠切除术以及回肠贮存袋肛管吻合术、末端回肠造瘘术为UC患者常用手术方案。术式不一,对QOL的影响亦有所差异^[28]。一项研究显示,对药物无应答者QOL较低,而行回肠吻合术后的UC患者在术后QOL有所提高,并与药物治疗应答组拥有同等水平的QOL。在众多术式中,行回肠造瘘术患者QOL(尤其在

社会功能方面)优于行回肠贮存袋肛管吻合术后的患者,后者在躯体疼痛和心理状况方面得分均较低^[28]。

疾病进程和治疗方案不仅能影响UC患者生理状况,其在社会关系领域中如:工作能力、入学、参加休闲活动或结交异性、性生活方面;情感功能领域如:日常生活自理能力下降,由疾病引起的羞耻感、恐惧感、厌恶感、窘迫感和无助感,以及对手术和并发肿瘤可能的担忧、恐惧等方面也受到影响。研究显示,约80%的UC患者具有不同程度的心理障碍。处于紧张、忧郁的心理状况则使患者QOL下降,而心理状况的改善有助于QOL的改善^[29]。越来越多的研究结果表明,UC患者情绪稳定性差,常伴有焦虑、敏感、固执、紧张,其中最突出的是焦虑,此在一定程度上促进了疾病的发生和恶化^[30,31]。同时各种应激、心理创伤也可促使UC的发生或复发,故情绪障碍与UC之间有着不可忽视的相互影响关系。因此,通过改变患者的认识过程、改变患者的观念来纠正患者的情绪和行为,从而减轻或消除症状,有利于疾病的康复。在药物治疗基础上,国内外学者亦已逐步开始对UC患者开展心理干预、认知行为疗法,该疗法不仅利于患者临床症状的改善,而且对QOL的提高起着重要作用^[32]。国外研究表明,包括压力管理、自身护理策略等共60 h的综合生活方式治疗方案,使UC患者QOL有所改善,但随着治疗时间的延长,治疗效果不复存在^[30,33]。虽然这些研究结果尚未达成一致,但对患者进行心理辅导以及生活方式调适等治疗,有利于患者症状的减轻和减少就诊次数。

2.3 工作领域 一项来自挪威的研究提示:对比一般人群,失业和请病假在UC患者中更常见,失业、请病假或领伤残抚恤患者的QOL得分也显著下降。IBD患者失业率为11.7%(UC比CD患者比例更高),而一般人群为4.1%;UC患者由于各种原因请病假比率为47%,而与肠道炎症相关的病假率为18%。其中,75%的患者请病假<4 wk。虽伤残率与一般人群相类似,但该病患者休病假的时间比一般人群多^[34]。

2.4 社会保障等领域 该病患者需面对由于长期就诊带来的经济影响,以及其他开销,包括被保险和抵押所拒绝等问题^[35]。另外,性别、教育程度也为影响患者QOL的重要因素。研究表明,男性、高学历者拥有更好的QOL^[36]。

3 相关量表研究概况

自20世纪80年代UC、IBD的QOL研究已见于众

多的国外文献中, 而国内则仅处于起步阶段。作为IBD的一种, UC炎与其他IBD具有许多相似之处, 故目前QOL研究多采用IBD相关的量表, 而鲜见单一针对UC的量表。目前主要采用普适性和疾病特异性量表两类量表进行评价。

3.1 普适性量表 普适性量表主要用于各种疾病患者QOL的宏观评价, 方便不同人群的横向比较。其缺点是填写和计分较为复杂, 可能发现不了重要的临床变化, 且不能反映各种疾病特异性变化。常用的普适性量表有: SF-36量表^[37,38]、疾病影响程度量表(sickness impact profile, SIP)、世界卫生组织QOL量表(WHOQOL-100)、Questions on life satisfaction生活满意度问卷(FLZM)等。其中以SF-36量表最为常用, 其主要用于不同人群、不同疾病患者的QOL比较。该量表涉及8个方面, 共36个问题: 躯体疼痛、整体健康状况、心理健康、生理功能、社会功能、情感角色、机能状况和精力等领域。

3.2 特异性量表 特异性量表的优点是能反映某一特定人群的最重要问题, 对因时间或治疗导致的变化更敏感; 而缺点则是过分关注疾病方面而忽略了其他方面, 填写和计分较复杂, 可能发现不了意料之外影响QOL的因素。相关的疾病特异性量表有许多版本, 如IBD问卷(inflammatory bowel disease questionnaire, IBDQ)及其简化版、患者关注评分表(rating form of inflammatory bowel disease patient concerns, RFIPC)^[39,40]、胃肠症状等级量表(gastrointestinal symptom rating scale, GSRS)^[41]、UC和CD健康状况量表(ulcerative colitis and Crohn's disease health status scales, UC/CD HSS)^[42]、简易健康量表(the short health scale, SHS)^[43]等。其中, IBDQ为目前已被证实并应用最广的应用于测评IBD患者QOL的疾病特异性量表, 其量表信效度评价也最完整, 曾被先后研制更多的延伸和简化版本^[43-45], 并翻译和修订为多种语言版本^[46-52]。翻译的版本基本被证实信效度良好, 只有少数提出修改意见^[53]。在Patient-Reported Outcome and Quality of Life Instruments数据库上亦见有中文翻译版本。2004年曾有周璐、陆华新对IBDQ进行了汉化研究, 并于2007年经过初步的文化调适以及信度、效度的测评, 证实中文版的IBDQ具有良好的信度和效度, 适用于评价我国IBD患者的QOL^[54]。

3.3 普适性量表SF-36和特异性量表IBDQ的对比评价 众多学者致力于寻找一个能全面反映UC患者QOL的量表。研究表明, IBDQ在辨别组

间疾病特异性变化、疾病活动程度方面略胜一筹, 而SF-36在疾病并发症方面有更好的区分能力, 故认为此两者之间能相互补充。虽两者均建立在对量表能充分反映患者主观感受的假定基础上, 但SF-36主要来源于专家及医疗护理文献, 其条目研制过程并无患者的直接参与。故两者的最大区别在于IBDQ量表条目的产生过程中是否有患者的直接参与。因此, 虽两者均能体现患者的QOL, 然而从条目研制的过程看来, 只有IBDQ能真正地反映患者的切身感受, 属于患者报告结局指标(patient reported outcomes, PRO)的范畴。尽管如此, IBDQ亦有其内在问题, 由于他的条目仅源于疾病对患者的负面影响, 并非患者对于疾病的全面的精确体会, 故若患者由于患病而引起的一些积极性的变化如: 疾病导致的健康饮食习惯的转变等, 则不能在该量表中得以体现。在Wolfe等的研究发现, 对于疾病所致患者常见的认知能力、自我调节、实践方面的功能下降等(方面)在SF-36量表和IBDQ均未有提及^[55]。疾病造成了患者严重的经济负担和大量的时间耗费, 但似未受到相应的重视, 多数量表中对此的关注与其造成的影响程度却呈负相关^[55]。针对以上问题, 下阶段还须进一步完善研究。

4 国内研究现状

目前国内文献中使用的量表主要是IBDQ、SF-36量表、生活质量指数(QL-Index)问卷、汉密顿焦虑量表(HAMA)、汉密顿抑郁量表(HAMD)等为主。其中, IBDQ于2003年被修订为香港中文版, 由于地域、经济、文化等方面的差异, 该版本被认为不适用于内地, 并于2003年由浙江大学周云仙、任蔚虹等按该量表开发者Irvine提供的标准修订程序和规范进行修订, 其后对中文版量表进行测评, 提示其信度、效度和反应度均较好。该研究中显示, 除了疾病活动指数、就诊次数、病程、糖皮质激素不良反应等, 患者发病前吸烟史和吸烟量、发病后吸烟史和吸烟量、中药等均为影响QOL的重要因素^[56]。在中医领域, 已有研究者建立了中医脾胃系疾病PRO量表, 该量表以形神统一、天人相应、七情相关为结构基础, 分为生理和疾病两大领域, 为中医领域消化道疾病QOL研究开创了先河, 可进一步推广应用^[57,58]。

在应用上, 国内已关注QOL在药物疗效评价中的作用, 但部分研究仍欠规范。如有使用患者主观满意度进行测评, 但具体使用量表以及

■同行评价

本文为读者了解溃疡性结肠炎患者的生存质量提供依据, 但可读性一般。

版本均未有说明^[59]。针对患者心理因素在QOL的重要作用,国内研究已运用认知行为疗法对UC患者进行一系列的心理治疗,并对改善患者QOL起了一定的作用^[32]。

5 结论

QOL是从患者角度衡量疾病和治疗对患者造成的影响。作为一种慢性反复发作性的疾病,UC患者的QOL比正常人明显降低。就青少年患者而言,疾病周围人群QOL也有不同程度的下降。然而,这些下降并非仅由疾病致生理功能改变引起,更主要的是对总体健康的认知能力、社会心理功能方面。其影响因素呈多样性,包括:疾病的严重程度、治疗效果、心理功能、生产效率以及旷工、性别与学历等。有效的治疗能显著提高患者的QOL,甚至在某些研究中其水平能与正常人群持平,但可随病情的反复而波动。要对UC患者作出全面的疗效评价,不应仅仅着眼于炎症指标、实验室检查结果的好转,而且还应注重患者自身感受的改善。因此,在治疗的全过程,临床医师都应重视UC患者QOL的提高。这就包括了治疗方案的优化,使药品不良反应、治疗费用等均要符合患者生活水平,既能减轻患者临床症状,缓解疾病,而且尚应不良反应少,使患者依从性好,同时也不会大大增加患者经济负担,不会因疾病受到社会歧视或轻视等。当然,这一治疗方案,也包括了对患者进行适当的心理调适,使患者不仅在生理领域改善,而且也从心理领域改善,从而获得整体的提高,这也符合目前生物-心理-社会的医学模式,也是中医整体观的体现。除此以外,相关医疗机构也应关注该类患者医疗保障、工作就业、社交活动等方面的困难,予以适当的帮助,使UC患者能够得到有效的医疗救助,重新建立对生活和工作的信心,促进疾病的恢复。

作为患者自身感受的真实反映,QOL在UC患者临床疗效评价中起了重要作用,这也是临床医师关注的热点之一。国外研究量表已相对成熟,但就国内而言,不仅相关量表数量少,即便对于其他领域,也同时存在量表使用不规范(研制、翻译、使用过程欠规范,量表选择缺乏针对性,未有系统化管理^[60-65])等不足之处。正所谓“工欲善其事,必先利其器”,建立中华文化指导下、适合国人使用的UC量表势在必行。

6 参考文献

1 郑红斌. 溃疡性结肠炎全球发病情况比较. 中华消化

杂志 2001; 21: 242-243

- 2 Leong RW, Lau JY, Sung JJ. The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 646-651
- 3 Al-Ghamdi AS, Al-Mofleh IA, Al-Rashed RS, Al-Amri SM, Aljebreen AM, Isnani AC, El-Badawi R. Epidemiology and outcome of Crohn's disease in a teaching hospital in Riyadh. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1341-1344
- 4 Sood A, Midha V, Sood N, Bhatia AS, Avasthi G. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Punjab, North India. *Gut* 2003; 52: 1587-1590
- 5 Lee YM, Fock K, See SJ, Ng TM, Khor C, Teo EK. Racial differences in the prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in Singapore. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 622-625
- 6 欧阳钦, Rakesh, Tandon KL Goh, 潘国宗, KM Fock, Claudio Fiocchi, SK Lam, 萧树东, 张虎, 梁红亮, 王玉芳. 亚太地区炎症性肠病处理共识意见(一). 胃肠病学 2006; 11: 233-238
- 7 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- 8 韩英. 炎症性肠病遗传学与临床关联的研究现状及进展. 中华消化杂志 2006; 26: 142-144
- 9 Bernklev T, Jahnsen J, Lygren I, Henriksen M, Vatn M, Moum B. Health-related quality of life in patients with inflammatory bowel disease measured with the short form-36: psychometric assessments and a comparison with general population norms. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 909-918
- 10 Petrak F, Hardt J, Clement T, Börner N, Egle UT, Hoffmann SO. Impaired health-related quality of life in inflammatory bowel diseases: psychosocial impact and coping styles in a national German sample. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 375-382
- 11 Janke KH, Klump B, Gregor M, Meisner C, Haeuser W. Determinants of life satisfaction in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 272-286
- 12 Mokrowiecka A, Jurek K, Pińkowski D, Malecka-Panas E. The comparison of Health-Related Quality of Life (HRQL) in patients with GERD, peptic ulcer disease and ulcerative colitis. *Adv Med Sci* 2006; 51: 142-147
- 13 Nordin K, Pählman L, Larsson K, Sundberg-Hjelm M, Löf L. Health-related quality of life and psychological distress in a population-based sample of Swedish patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 450-457
- 14 Pace F, Molteni P, Bollani S, Sarzi-Puttini P, Stockbrügger R, Bianchi Porro G, Drossman DA. Inflammatory bowel disease versus irritable bowel syndrome: a hospital-based, case-control study of disease impact on quality of life. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 1031-1038
- 15 Rudick RA, Miller D, Clough JD, Gragg LA, Farmer RG. Quality of life in multiple sclerosis. Comparison with inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis. *Arch Neurol* 1992; 49: 1237-1242
- 16 Janke KH, Raible A, Bauer M, Clemens P, Meisner C, Häuser W, Steder-Neukamm U, Henrich G, Herschbach P, Gregor M, Klump B. Questions on life satisfaction (FLZM) in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 343-353
- 17 Richardson G, Griffiths AM, Miller V, Thomas AG. Quality of life in inflammatory bowel disease: a cross-cultural comparison of English and Canadian children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32:

- 573-578
- 18 Akobeng AK, Miller V, Firth D, Suresh-Babu MV, Mir P, Thomas AG. Quality of life of parents and siblings of children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: S40-S42
- 19 Kim WH, Cho YS, Yoo HM, Park IS, Park EC, Lim JG. Quality of life in Korean patients with inflammatory bowel diseases: ulcerative colitis, Crohn's disease and intestinal Behçet's disease. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14: 52-57
- 20 Kuriyama M, Kato J, Kuwaki K, Morimoto N, Nawa T, Fujimoto T, Kono H, Okano N, Miyaike J, Morita T, Okada H, Suzuki S, Yoshioka T, Shiode J, Suwaki K, Sakaguchi K, Shiratori Y. Clinical factors that impair health-related quality of life in ulcerative colitis patients vary with the disease duration. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 634-641
- 21 Kane S, Huo D, Aikens J, Hanauer S. Medication nonadherence and the outcomes of patients with quiescent ulcerative colitis. *Am J Med* 2003; 114: 39-43
- 22 Kane S, Huo D, Magnanti K. A pilot feasibility study of once daily versus conventional dosing mesalamine for maintenance of ulcerative colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 170-173
- 23 Prantera C, Viscido A, Biancone L, Francavilla A, Giglio L, Campieri M. A new oral delivery system for 5-ASA: preliminary clinical findings for MMx. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 421-427
- 24 Shale MJ, Riley SA. Studies of compliance with delayed-release mesalazine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 191-198
- 25 Levy RL, Feld AD. Increasing patient adherence to gastroenterology treatment and prevention regimens. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1733-1742
- 26 Bernklev T, Jahnsen J, Schulz T, Sauar J, Lygren I, Henriksen M, Stray N, Kjellevoid Ø, Aadland E, Vatn M, Moum B. Course of disease, drug treatment and health-related quality of life in patients with inflammatory bowel disease 5 years after initial diagnosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 1037-1045
- 27 Feagan BG, Reinisch W, Rutgeerts P, Sandborn WJ, Yan S, Eisenberg D, Bala M, Johans J, Olson A, Hanauer SB. The effects of infliximab therapy on health-related quality of life in ulcerative colitis patients. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 794-802
- 28 Berndtsson I, Oresland T. Quality of life before and after proctocolectomy and IPAA in patients with ulcerative proctocolitis--a prospective study. *Colorectal Dis* 2003; 5: 173-179
- 29 Vidal A, Gómez-Gil E, Sans M, Portella MJ, Salameiro M, Piqué JM, Panés J. Health-related quality of life in inflammatory bowel disease patients: the role of psychopathology and personality. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 977-983
- 30 张西亮, 许春进, 丁辉. 认知行为疗法对溃疡性结肠炎伴情绪障碍患者生活质量的影响. *中国医师进修杂志* 2007; 30: 47-49
- 31 Mittermaier C, Dejaco C, Waldhoer T, Oefflerbauer-Ernst A, Miehsler W, Beier M, Tillinger W, Gangl A, Moser G. Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. *Psychosom Med* 2004; 66: 79-84
- 32 傅谧亚, 武成. 心身并治溃疡性结肠炎的临床观察. *天津中医* 2002; 19: 49
- 33 Kennedy A, Robinson A, Hann M, Thompson D, Wilkin D. A cluster-randomised controlled trial of a patient-centred guidebook for patients with ulcerative colitis: effect on knowledge, anxiety and quality of life. *Health Soc Care Community* 2003; 11: 64-72
- 34 Bernklev T, Jahnsen J, Henriksen M, Lygren I, Aadland E, Sauar J, Schulz T, Stray N, Vatn M, Moum B. Relationship between sick leave, unemployment, disability, and health-related quality of life in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 402-412
- 35 Bassi A, Dodd S, Williamson P, Bodger K. Cost of illness of inflammatory bowel disease in the UK: a single centre retrospective study. *Gut* 2004; 53: 1471-1478
- 36 Casellas F, López-Vivancos J, Casado A, Malagelada JR. Factors affecting health related quality of life of patients with inflammatory bowel disease. *Qual Life Res* 2002; 11: 775-781
- 37 Ware JE Jr, Sherbourne CD. The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. *Med Care* 1992; 30: 473-483
- 38 李春波, 何燕玲. 健康状况调查问卷SF-36的介绍. *国外医学·精神病学分册* 2002; 29: 116-119
- 39 Drossman DA, Leserman J, Li ZM, Mitchell CM, Zagami EA, Patrick DL. The rating form of IBD patient concerns: a new measure of health status. *Psychosom Med* 1991; 53: 701-712
- 40 Pallis AG, Mouzas IA. Instruments for quality of life assessment in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2000; 32: 682-688
- 41 Revicki DA, Wood M, Wiklund I, Crawley J. Reliability and validity of the Gastrointestinal Symptom Rating Scale in patients with gastroesophageal reflux disease. *Qual Life Res* 1998; 7: 75-83
- 42 Drossman DA, Li Z, Leserman J, Patrick DL. Ulcerative colitis and Crohn's disease health status scales for research and clinical practice. *J Clin Gastroenterol* 1992; 15: 104-112
- 43 Hjortswang H, Järnerot G, Curman B, Sandberg-Gertzén H, Tysk C, Blomberg B, Almer S, Ström M. The Short Health Scale: a valid measure of subjective health in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 1196-1203
- 44 Irvine EJ, Zhou Q, Thompson AK. The Short Inflammatory Bowel Disease Questionnaire: a quality of life instrument for community physicians managing inflammatory bowel disease. CCRPT Investigators. Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1571-1578
- 45 Alcalá MJ, Casellas F, Fontanet G, Prieto L, Malagelada JR. Shortened questionnaire on quality of life for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 383-391
- 46 Casellas F, Arenas JI, Baudet JS, Fábregas S, García N, Gelabert J, Medina C, Ochotorena I, Papo M, Rodrigo L, Malagelada JR. Impairment of health-related quality of life in patients with inflammatory bowel disease: a Spanish multicenter study. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 488-496
- 47 Cheung WY, Garratt AM, Russell IT, Williams JG. The UK IBDQ-a British version of the inflammatory bowel disease questionnaire. development and validation. *J Clin Epidemiol* 2000; 53: 297-306
- 48 de Boer AG, Wijker W, Bartelsman JF, de Haes HC. Inflammatory Bowel Disease Questionnaire: cross-cultural adaptation and further validation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 1043-1050

- 49 Ren WH, Lai M, Chen Y, Irvine EJ, Zhou YX. Validation of the mainland Chinese version of the Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (IBDQ) for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 903-910
- 50 Janke KH, Klump B, Steder-Neukamm U, Hoffmann J, Häuser W. [Validation of the German version of the Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (Competence Network IBD, IBDQ-D)]. *Psychother Psychosom Med Psychol* 2006; 56: 291-298
- 51 Pallis AG, Vlachonikolis IG, Mouzas IA. Quality of life of Greek patients with inflammatory bowel disease. Validation of the Greek translation of the inflammatory bowel disease questionnaire. *Digestion* 2001; 63: 240-246
- 52 Hjortswang H, Järnerot G, Curman B, Sandberg-Gertzén H, Tysk C, Blomberg B, Almer S, Ström M. Validation of the inflammatory bowel disease questionnaire in Swedish patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 77-85
- 53 Pallis AG, Mouzas IA, Vlachonikolis IG. The inflammatory bowel disease questionnaire: a review of its national validation studies. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 261-269
- 54 周璐, 陆华新. 炎症性肠病患者的健康相关生存质量. *中华内科杂志* 2004; 43: 392-394
- 55 Wolfe BJ, Sirois FM. Beyond standard quality of life measures: the subjective experiences of living with inflammatory bowel disease. *Qual Life Res* 2008; 17: 877-886
- 56 周云仙, 任蔚虹. 炎症性肠病生存质量问卷中文版的临床应用研究. 浙江: 浙江大学, 2006: 1-88
- 57 刘凤斌, 王维琼. 中医脾胃系疾病PRO量表理论结构模型的构建思路. *广州中医药大学学报* 2008; 25: 12-14
- 58 刘凤斌, 王维琼. 中医脾胃系疾病PRO量表的研制与条目筛选. *世界科学技术(中医药现代化)* 2009; 11: 527-531
- 59 王长海, 魏玉芳, 刘玉林, 蒋永培, 杨兰文, 姚菊峰, 李锋. 肠胃清胶囊对慢性溃疡性结肠炎患者生活质量主观满意度的影响. *中国临床康复* 2005; 9: 138-139
- 60 吴瑞英, 白夺龙, 张洪红, 林玉伙. 扶正口服液的制备及在食管癌化疗中的疗效观察. *海峡药学* 2001; 13: 14-15
- 61 吴继萍, 李艺, 冯妮, 贝立民. 复方红藤颗粒对放化疗患者生存质量影响的临床研究. *中医研究* 2004; 8: 17-18
- 62 张其慧, 黄俭, 刘苏中, 王丽平, 张丽莎, 吴眉. 中西医结合疗法改善31例SARS恢复期患者生存质量临床研究. *北京中医* 2004; 2: 22-24
- 63 冯柳青. 辨证分型施治对老年性糖尿病生存质量的影响. *现代康复* 2001; 5: 130
- 64 胡学军, 胥新元, 肖波飞. 中西医结合治疗对帕金森病患者生存质量及疗效的观察. *中医药学刊* 2004; 4: 707-708
- 65 梁玲, 朱汀, 孙寒静. 调平康对高血压患者生活质量影响的研究. *新中医* 2001; 33: 31-32

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

汤姆森-路透公布 2009 年 *WJG* 影响因子 2.092

本刊讯 根据2010-06-18汤姆森-路透发布的2009年度期刊引证报告, *World Journal of Gastroenterology(WJG)*(中文刊名《世界胃肠病学杂志》)影响因子为2.092, 论文总被引次数12 740次, 特征因子0.05832, 分别位于65种国际胃肠肝病学期刊的第33位, 8位和5位。

与2008年的影响因子(2.081), 总被引次数(10 822次), 特征因子(0.05006)相比, *WJG*在2009年国际胃肠肝病学期刊中的排名分别增加了7个百分点, 4个百分点和3个百分点。(*WJG*编辑部主任: 程剑侠 2010-06-18)

NF- κ B信号通路与炎症性肠病

张善金, 李弼民

张善金, 李弼民, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 本文综述由张善金完成; 李弼民审校。

通讯作者: 李弼民, 副教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化内科。lbmjx@163.com

收稿日期: 2010-11-24 修回日期: 2011-01-17

接受日期: 2011-01-26 在线出版日期: 2011-02-18

NF- κ B signaling pathway and inflammatory bowel disease

Shan-Jin Zhang, Bi-Min Li

Shan-Jin Zhang, Bi-Min Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Associate Professor Bi-Min Li, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. lbmjx@163.com

Received: 2010-11-24 Revised: 2011-01-17

Accepted: 2011-01-26 Published online: 2011-02-18

Abstract

Inflammation is a defensive reaction involving a variety of cells and cytokines. However, serious or long-term inflammation may cause impairment of organisms. Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of gastrointestinal diseases characterized by chronic and periodic inflammation. Long-term, repeated gastrointestinal inflammation not only influences the quality of life of patients but also increases the risk of fibrosis and carcinoma in the intestinal tract. It has been demonstrated that nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling has a close relationship with inflammation. The aim of this paper is to discuss the relationship between NF- κ B signaling pathway and IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Nuclear factor-kappa B; Signal pathway

Zhang SJ, Li BM. NF- κ B signaling pathway and inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 505-509

摘要

炎症是多种细胞及细胞因子参与的机体防御

性反应, 但严重或长期的炎症则会造成机体损伤。炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组以慢性、周期性炎症为特征的胃肠道疾病, 长期、反复的胃肠道炎症不仅影响患者生活质量, 而且增加了肠道纤维化及癌变的风险, 而核因子Kappa B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)与炎症反应关系非常密切。本文就NF- κ B信号通路与IBD的联系作一简要概述。

关键词: 炎症性肠病; 核因子 κ B; 信号通路

张善金, 李弼民. NF- κ B信号通路与炎症性肠病. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 505-509

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/505.asp>

0 引言

炎症性肠病包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's, CD), 是一组病因及发病机制尚不十分清楚的胃肠道慢性炎症性疾病, 目前认为与遗传、环境及免疫等因素有关。NF- κ B在调控炎症反应起非常重要的作用, 如果能在NF- κ B信号通路基础上寻找新的药物, 那么就有可能打破现有药物的局限性, 减少传统药物的不良反应, 提高患者的生活质量。

1 NF- κ B的活化

1.1 NF- κ B结构 NF- κ B最初是由Sen和Baltimore等发现的一种能与免疫球蛋白 κ 链基因的增强子 κ B序列特异结合的核蛋白, 由5个亚单位组成: NF- κ B1(P50), NF- κ B2(P52), RelA(P65), RelB和c-Rel, 其中P50和P52是没有激活结构域^[1]。他们以同源或异源二聚体的形式存在, 其中以P50/RelA最为常见^[2], NF- κ B蛋白共同拥有大约为300个氨基酸Rel的同源结构域, 此区域负责与DNA结合、二聚体化和核定位。通常NF- κ B与其抑蛋白I κ B结合形成无活性的复合物存在于细胞质中, 当I κ B发生磷酸化和泛素化进而被蛋白酶体降解时, 游离的NF- κ B转入细胞核内, 与DNA结合, 调控其目的基因的转录^[3]。NF- κ B参与调节各种生理和病理过程, 如炎症、天然和

■背景资料

炎症性肠病是一组以慢性、反复发作作为特征的肠道炎症性疾病, 本病主要以欧美多见, 但我国的发病率呈逐年上升趋势。该病病因及发病机制尚不明确, 内科治疗主要以控制活动期及诱导和维持缓解期为目的, 不仅无法治愈本病, 且效果不佳。近年来大量基础研究表明NF- κ B信号通路与肠道炎症关系密切, 如以此信号通路为基础研究, 有望开发出效果更好的新型药物, 打破现有传统药物的僵局, 甚至可以明确该病的发病机制。

■同行评议者

陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科

■相关报道

Stefan等研究发现NF- κ B反义寡核苷酸可以有效地阻止三硝基苯磺酸诱导实验性结肠炎小鼠肠道由Th1或Th2介导的炎症的发生,减轻小鼠肠道的炎症反应。

获得免疫应答以及细胞存活^[4]。

1.2 NF- κ B抑制蛋白 目前已发现5种蛋白可以抑制NF- κ B的活化,其中包括3种NF- κ B抑制因子: I κ B α , I κ B β 和I κ B ϵ 及2种NF- κ B前体蛋白P105和P100,所有的抑制蛋白都拥有与NF- κ B结合的锚蛋白重复序列结构域(ARD)^[5],其中几种蛋白的氨基末端调节区有被I κ B激酶(I κ B kinase, IKK)磷酸化位点,羧基末端含有PEST降解序列。I κ B α 囊括了I κ B β 和I κ B ϵ 的抑制功能,并且通常是与P50/RelA结合^[6]。游离的I κ B α 的热力学稳定性是非常低的,并且很快地被蛋白酶体降解,这一过程不需要发生磷酸化和泛素化^[7],最近有研究表明I κ B α 快速的合成和降解为对抗代谢性应激提供了一种机制。

1.3 IKK、IKK复合物 包括两种激酶亚基IKK α 、IKK β ,以及一种调节亚基NEMO(IKK γ)。当NEMO发生泛素化并且至少一种IKK激酶磷酸化时IKK才能被激活,活化的IKK使I κ B发生磷酸化并降解,从而激活NF- κ B。

1.4 NF- κ B两条重要信号通路 许多种受体与配体结合可以使NF- κ B活化,但对于认识NF- κ B激活信号研究最多的是肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家庭和Toll/IL-1受体(Toll/interleukin-1 receptor, TIR)家族^[6],后者由Toll受体(Toll-like receptors, TLRs)和白介素-1受体(interleukin-1 receptors, IL-1Rs)构成。

1.4.1 TNF通路: TNFR家族由TNFR1(P55)和TNFR2(P75)两型组成。当TNF与TNFR相互作用后,受体发生三聚体化,并招集TNFR相关死亡结构域蛋白(TNFR1-associated death domain protein, TRADD)形成TNFR-TRADD复合物,在经典的NF- κ B信号通路中, TNFR-TRADD复合物招集TNFR相关因子2(TNFR-associated factor 2, TRAF)和受体相关蛋白(receptor-interacting protein, RIP), TRAF可以使RIP泛素化。RIP是此信号通路的关键接头蛋白,共有7个成员,他们都有保守的丝氨酸/苏氨酸激酶区域,他通过与IKK的NEMO亚基结合使IKK集于TNFR复合物,从而活化IKK,启动NF- κ B信号通路。

1.4.2 TLRs通: TLRs与核苷酸寡聚化结构域(nucleotide oligomerization domain, NOD)同属于模式受体(pattern recognition receptors, PPRs)家族,不同的是TLRs位于细胞外,而NOD则位于细胞质。TLRs由胞膜外区,胞质区和跨膜区组成,且均为I型跨膜蛋白,因其胞内段与人IL-1R胞质区同源,故称为TIR结构域。到目前为止,已发

现人类至少有11种TLRs,而鼠类有13种,他们主要表达于抗原加工和提呈细胞,如巨噬细胞、中性粒细胞及树突状细胞(dendritic cells, DCs),另外,不同的TLR可以组合在一起。TLRs可以识别包括病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)在内的配体,是衔接天然免疫和获得性免疫的桥梁,在机体天然免疫对病原体的识别起重要作用。

当TLR与配体结合时,本身发生多聚体化,然后TIR结构域集聚衔接蛋白MYD88、TRIF、TIRAP。MYD88与白介素-1受体相关激酶(IL-1 receptor associated kinase, IRAK-1)相互作用,后者属于丝/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine activated kinase),使IRAK-4磷酸化IRAK-1,激发IRAK-1发生自身磷酸化,磷酸化的IRAK-1从受体复合中分离出来,并且结合于肿瘤坏死因子受体相关因子-6(TRAF6), IRAK-1/TRAF6复合物活化转化生长因子 β 激活性激酶(transforming growth factor β activated kinase 1, TAK1)/转化生长因子 β 激活性激酶结合蛋白(TAK1-binding protein 1, TAB1)复合物,后者可以激活IKK。

2 IBD与可能的致病因素

2.1 IBD与遗传 许多流行病学资料认为遗传因素与IBD的关系十分密切,例如有5%-20%的IBD患者有IBD家族史,并且同卵双生子IBD的发病率明显比双卵双生子要高^[8],更有力的证据就是NOD2/CARD15基因于2001年被证实与CD的易感性有关^[9]。NOD2表达于肠上皮细胞(也包括潘氏细胞和单核细胞),他可以识别胞壁酰二肽(MDP)等抗原,使IKK的调节亚基NEMO泛素化,进而活化NF- κ B^[10,11]。也有研究表明位于IBD3的TNF- α 相关基因的启动子区序列-308G/A单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)会增加UC的风险性^[12]。此外,全基因组关联研究(GWAS)发现了一系列的IBD易感基因座,如IL23R^[13]、STAT3、JAK2、IL-23^[14],这些基因座与CD和/或UC联系紧密^[15]。

2.2 IBD与环境 IBD好发于工业化国家,在北美,UC的发病率为2.2-14.3/100 000人年数,CD为3.1-14.6/100 000人年数,近年来低发病率地区如日本、南韩、新加坡、拉丁美洲IBD也在上升^[16],而在同卵双生子中IBD的发病率也低于100%^[8],这些都说明了环境因素影响IBD的发生和发展。此外吸烟、饮食、阑尾切除术、职业

等因素与IBD有关。

2.3 IBD与免疫 20世纪50年代末, 60年代初, UC患者结肠上皮细胞自身抗体的发现指示免疫因素在IBD的发病机制中占非常重要的地位^[17]。一般认为CD是IL-12介导的Th1型反应而UC是Th2型, 但也有研究表明在肠道慢性炎症起重要作用的是由IL-12p40和IL-23p19两个亚基构成IL-23, 而不是IL-12, 从而使我们必须重新评估IL-12和IL-23在各种炎症性疾病的作用^[18]。肠道天然免疫和获得性免疫对肠腔内微生物免疫应答的紊乱认为参与了IBD的发病机制^[19], 而肠道对抗原的免疫反应受肠上皮细胞和肠树状细胞的控制^[20]。

2.3.1 肠上皮细胞: 肠上皮细胞参与了肠道屏障的结构, 他可以阻止外来抗原与固有层上的免疫细胞接触, 而肠上皮的屏障功能的破坏可能是IBD发病机制中重要的机制^[21], 有研究发现炎症性肠病患者肠上皮细胞缺乏对抑制性T细胞诱导^[22]。当肠上皮细胞表面TLR识别特定的微生物相关分子模式时, TLR则通过激活NF- κ B引发炎症, 一旦炎症发生, 肠上皮细胞胞质中NOD的表达也会增加^[20], 此外其可以分泌抗微生物肽而在天然的宿主防御中起很重要作用^[23]。

2.3.2 肠DCs: DCs是体内功能最强的专职抗原递呈细胞, 在天然免疫和获得性免疫之间扮演着“信使”的角色。DCs通过与调节T淋巴细胞和效应T淋巴细胞相互作用从而达到对肠道内自身抗原、食物抗原以及肠道内共生菌的耐受^[24]。DCs主要分布于Peyer's淋巴结(Peyer's patches, PPs)、肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes, MLN)以及固有层, 就功能而言, DCs分为非成熟型和成熟型, 前者存在于外周组织, 起吞噬作用, 即抗原采集, 后者存在于淋巴器官, 起抗原递呈, 在炎症的刺激下非成熟型DCs从外周迁移于淋巴结, 事实上迁移是其成熟的过程^[25]。肠道内的DCs一般通过如下途径摄取肠腔内的抗原: 第一, 固有层的DCs直接从上皮细胞间伸出轴突摄取抗原; 第二, 通过PP顶部的M细胞传递给PPs内的DCs。DCs是通过PRRs来提取抗原的, 在CD, 肠道的DCs高表达TLR2和TLR4^[26]。成熟的DCs与T淋巴细胞相互作用后使T淋巴细胞分化成各种功能的细胞, 此外, 其自身可以分泌Th1特征的细胞因子IL-12、IL-23、IL-18以及Th2特征的细胞因子IL-4^[27]。

2.3.3 肠道内微生物: 肠道内至少有400种细菌, 这些微生物影响着黏膜结构、功能及其免疫系

统的发育^[28], 而且其代谢产物如维生素K、叶酸盐和短链脂肪酸是肠道丰富的营养物质。无菌状态下实验性小鼠动物模型不会发生结肠炎以及口服抗菌药可以缓解IBD患者的症状表明细菌参与了IBD发病^[29,30]。

3 目前IBD的生物治疗

药物仍是IBD治疗的主要手段, 传统药物如氨基水杨酸类、糖皮质激素、抗菌素、免疫抑制剂等仍占据主导作用, 而他们给患者带来的各种不良反应和并发症目前还是得不能解决^[31]。近年来随着生物制剂的崛起, 药物治疗在过去的十年得到巨大的发展, 抗TNF制剂如英夫利昔单抗(infliximab)、阿达木(adalimumab)、聚乙二醇化西他利珠(certolizumab)早已应用于临床治疗CD, 只有英夫利昔单抗最近才用于治疗UC^[32]。此外, 重组人细胞因子、生长因子、抗T淋巴细胞制剂、Th1细胞极化抑制剂、抗IL-6受体抗体制剂等目前也在临床上使用, 但都存在较多的不良反应, 而益生菌通过拮抗IBD患者肠道内致病菌的生长, 改善菌群失调, 达到保护肠道生态和肠道屏障功能, 且无明显副作用。当然人们也越来越关注生物制剂存在的安全性的问题, 如抗TNF药物会增加肺结核感染^[33]、出现局部注射反应以及可能会导致非霍奇金淋巴瘤的发生^[34]等, 但我们应该利用好生物制剂这把双刃剑, 并创造出作用部位局限、全身反应小的生物药品。

4 NF- κ B与肠道慢性炎症

当脂多糖、肽聚糖、脂磷壁酸、胞壁酰二肽等抗原与肠道抗原提呈细胞PPRs(TLRs、NOD等)相结合, 一方面激活NF- κ B信号通路, 自身分泌细胞因子, 另一方面则启动肠道获得性免疫, 被激活的免疫细胞产生白介素、肿瘤坏死因子、干扰素等炎症因子, 而这些炎症因子又可以反作用于NF- κ B信号通路, 使更多的NF- κ B蛋白转移到核内, 调控多种炎症因子相关基因的表达, 进一步加重肠道炎症反应, 所以如果能阻止NF- κ B信号通路的开放, 就可能有效地控制肠道炎症。目前主要治疗IBD的药物如氨基水杨酸类、糖皮质激素的作用机制也与NF- κ B相关^[35,36], 而TNF- α 单克隆抗体(英夫利昔单抗)则直接阻止TNF- α 与受体结合, 大大减少了NF- κ B信号的放大。此外环孢A素、中药(如姜黄)、L-肌肽锌等也能抑制NF- κ B的活性, 而NF- κ B反义寡核苷酸更是

■创新盘点

信号通路是非常复杂的, 目前对炎症性肠病的认识也不够充分, 而本文把NF- κ B信号通和IBD有机地联系在一起, 并为新的治疗炎症性肠病药物如NF- κ B反义寡核苷酸、NF- κ B抑制剂等临床研发提供了一定的方向。

■同行评价

本文科学性和可读性较好, 具有较好的理论价值。

可能成为将来治疗IBD的主要药物。

5 结论

NF- κ B信号通路是非常复杂的, 而其与IBD肠道炎症的关系密切, 如果能够开发出靶向性更强、毒性更小的, 更为有效地阻止NF- κ B的核转移或是其与核内DNA结合的药物, 这样不仅可以更有效地缓解IBD患者的症状, 而且可以大大减少药物的不良反应, 进一步改善患者的生活质量。

6 参考文献

- 1 Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF- κ B activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 64-73
- 2 Visekruna A, Joeris T, Seidel D, Kroesen A, Loddenkemper C, Zeitz M, Kaufmann SH, Schmidt-Ullrich R, Steinhoff U. Proteasome-mediated degradation of IkappaB α and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2006; 116: 3195-3203
- 3 Bergqvist S, Ghosh G, Komives EA. The IkappaB α /NF- κ B complex has two hot spots, one at either end of the interface. *Protein Sci* 2008; 17: 2051-2058
- 4 Marienfeld RB, Palkowitsch L, Ghosh S. Dimerization of the I kappa B kinase-binding domain of NEMO is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF- κ B activity. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 9209-9219
- 5 Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF- κ B signaling system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19: 187-197
- 6 Leeman JR, Gilmore TD. Alternative splicing in the NF- κ B signaling pathway. *Gene* 2008; 423: 97-107
- 7 Truhlar SM, Mathes E, Cervantes CF, Ghosh G, Komives EA. Pre-folding IkappaB α alters control of NF- κ B signaling. *J Mol Biol* 2008; 380: 67-82
- 8 Cho JH. Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 338-347
- 9 Walters TD, Silverberg MS. Genetics of inflammatory bowel disease: current status and future directions. *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 633-639
- 10 Abbott DW, Yang Y, Hutti JE, Madhavarapu S, Kelliher MA, Cantley LC. Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 6012-6025
- 11 Barnich N, Aguirre JE, Reinecker HC, Xavier R, Podolsky DK. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* 2005; 170: 21-26
- 12 Ferguson LR, Huebner C, Petermann I, Gearry RB, Barclay ML, Demmers P, McCulloch A, Han DY. Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4652-4661
- 13 Zhernakova A, Festen EM, Franke L, Trynka G, van Diemen CC, Monsuur AJ, Bevoova M, Nijmeijer RM, van 't Slot R, Heijmans R, Boezen HM, van Heel DA, van Bodegraven AA, Stokkers PC, Wijmenga C, Crusius JB, Weersma RK. Genetic analysis of innate immunity in Crohn's disease and ulcerative colitis identifies two susceptibility loci harboring CARD9 and IL18RAP. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 1202-1210
- 14 Sato K, Shiota M, Fukuda S, Iwamoto E, Machida H, Inamine T, Kondo S, Yanagihara K, Isomoto H, Mizuta Y, Kohno S, Tsukamoto K. Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population. *J Clin Immunol* 2009; 29: 815-825
- 15 Mikhailov TA, Furner SE. Breastfeeding and genetic factors in the etiology of inflammatory bowel disease in children. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 270-279
- 16 Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126: 1504-1517
- 17 Wen Z, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: autoimmune or immune-mediated pathogenesis? *Clin Dev Immunol* 2004; 11: 195-204
- 18 Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 2006; 203: 2473-2483
- 19 Frolova L, Drastich P, Rossmann P, Klimesova K, Tlaskalova-Hogenova H. Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: up-regulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 267-274
- 20 Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640
- 21 Canny GO, McCormick BA. Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? *Infect Immun* 2008; 76: 3360-3373
- 22 Mayer L, Eisenhardt D. Lack of induction of suppressor T cells by intestinal epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1990; 86: 1255-1260
- 23 Mueller C, Macpherson AJ. Layers of mutualism with commensal bacteria protect us from intestinal inflammation. *Gut* 2006; 55: 276-284
- 24 Niess JH. Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5138-5148
- 25 Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest* 2009; 119: 2441-2450
- 26 Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 435-446
- 27 Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 2003; 52: 1522-1529
- 28 Bai AP, Ouyang Q. Probiotics and inflammatory bowel diseases. *Postgrad Med J* 2006; 82: 376-382
- 29 Levin A, Shibolet O. Toll-like receptors in inflammatory bowel disease-stepping into uncharted territory. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5149-5153

- 30 Himmel ME, Hardenberg G, Piccirillo CA, Steiner TS, Levings MK. The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease. *Immunology* 2008; 125: 145-153
- 31 Engel MA, Neurath MF. New pathophysiological insights and modern treatment of IBD. *J Gastroenterol* 2010; 45: 571-583
- 32 Harris A, Feller ER, Shah SA. Medical therapy of IBD in 2009. *Med Health R I* 2009; 92: 78-81
- 33 Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001; 345: 1098-1104
- 34 D'Haens G. Risks and benefits of biologic therapy for inflammatory bowel diseases. *Gut* 2007; 56: 725-732
- 35 Bantel H, Berg C, Vieth M, Stolte M, Kruis W, Schulze-Osthoff K. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF-kappaB in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 3452-3457
- 36 甘华田, 欧阳钦, 陈友琴. 核因子- κ B p65反义寡核苷酸对溃疡性结肠炎肠黏膜单个核细胞细胞因子表达的影响. *生物医学工程杂志* 2003; 20: 268-272

编辑 曹丽鸥 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/*World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的500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。

氧化苦参碱诱导跨膜蛋白Claudin-1表达在重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜损害中的作用

张志强, 王燕庆, 董明, 崔建春, 荣大庆, 董齐

■背景资料

重症急性胰腺炎继发感染导致患者死亡占重症急性胰腺炎总死亡率的80%, 继发感染的主要因素是结肠内常驻细菌移位, 但细菌移位的途径及发生因素还不十分清楚, 通常认为是由于肠黏膜屏障损伤, 肠黏膜通透性增强引起。如何有效地保护肠道黏膜屏障, 抑制肠道细菌移位是目前还没有解决的难题。

张志强, 王燕庆, 崔建春, 荣大庆, 董齐, 辽宁省人民医院普外科 辽宁省沈阳市 110016

董明, 中国医科大学附属第一医院普外科 辽宁省沈阳市 110001

国家自然科学基金资助项目, No. 30840076

辽宁省自然科学基金资助项目, No. 20082058

作者贡献分布: 此课题由董齐、张志强及王燕庆设计; 动物模型制作和样本采集检测分析由张志强、王燕庆、崔建春及荣大庆操作完成; 论文写作由张志强、董齐及董明完成。

通讯作者: 董齐, 主任医师, 110016, 辽宁省沈阳市, 辽宁省人民医院普外科。Insrmyy@sina.com

电话: 024-24016710

收稿日期: 2010-10-23 修回日期: 2011-01-19

接受日期: 2011-01-27 在线出版日期: 2011-02-18

Oxymatrine induces the expression of transmembrane protein claudin-1 in the intestinal mucosa of rats with severe acute pancreatitis

Zhi-Qiang Zhang, Yan-Qing Wang, Ming Dong, Jian-Chun Cui, Da-Qing Rong, Qi Dong

Zhi-Qiang Zhang, Yan-Qing Wang, Jian-Chun Cui, Da-Qing Rong, Qi Dong, Department of General Surgery, People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016, Liaoning Province, China

Ming Dong, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30840076; the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 20082058

Correspondence to: Qi Dong, Department of General Surgery, People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016, Liaoning Province, China. Insrmyy@sina.com

Received: 2010-10-23 Revised: 2011-01-19

Accepted: 2011-01-27 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of oxymatrine (OM) on intestinal mucosal barrier dysfunction in rats with severe acute pancreatitis (SAP) and to analyze possible mechanisms involved.

METHODS: A rat model of SAP was established by peritoneal injection of 175 mg/100 g L-arginine. Eighty healthy male Wistar rats were divided randomly into four groups: control group, OM control group, SAP control group,

OM treatment group (1-, 12-, 24-, 36-, and 48-h subgroups). After treatment, plasma endotoxin and D-lactic acid levels were determined, the expression of claudin-1 mRNA in the tunica mucosa coli was detected by real-time polymerase chain reaction (real time-PCR), and the activity of claudin-1 was determined by Western blotting.

RESULTS: There were no significant differences in plasma levels of endotoxin and D-lactic acid and expression levels of claudin-1 mRNA and protein in the tunica mucosa coli between the control group and OM control group. Compared with the control group, plasma endotoxin and D-lactic acid levels were markedly increased, and the expression levels of claudin-1 mRNA and protein in the tunica mucosa coli were significantly decreased in the SAP control group ($0.61 \text{ EU/mL} \pm 0.01 \text{ EU/mL}$ vs $0.05 \text{ EU/mL} \pm 0.02 \text{ EU/mL}$; $8.38 \text{ mg/L} \pm 0.38 \text{ mg/L}$ vs $2.87 \text{ mg/L} \pm 0.50 \text{ mg/L}$, both $P < 0.01$). Compared with the SAP control group, the expression levels of claudin-1 mRNA and protein in the tunica mucosa coli were significantly increased and plasma levels of endotoxin and D-lactic acid were markedly decreased in the OM treatment group ($0.09 \text{ EU/mL} \pm 0.02 \text{ EU/mL}$ vs $0.61 \text{ EU/mL} \pm 0.01 \text{ EU/mL}$; $2.94 \text{ mg/L} \pm 0.42 \text{ mg/L}$ vs $8.38 \text{ mg/L} \pm 0.38 \text{ mg/L}$, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Plasma levels of endotoxin and D-lactic acid were markedly increased and expression levels of claudin-1 mRNA and protein in tunica mucosa coli were significantly decreased in SAP rats. OM intervention can markedly decrease plasma levels of endotoxin and D-lactic acid, increase claudin-1 mRNA and protein expression levels, and improve mucosal barrier dysfunction to prevent bacterial translocation in SAP rats.

Key Words: Oxymatrine; Severe acute pancreatitis; Intestinal mucosal barrier; Claudin-1

Zhang ZQ, Wang YQ, Dong M, Cui JC, Rong DQ, Dong Q. Oxymatrine induces the expression of transmembrane

■同行评议者

孙诚谊, 教授, 贵阳医学院附属医院院长办

protein claudin-1 in the intestinal mucosa of rats with severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2011; 19(5): 510-514

摘要

目的: 探讨氧化苦参碱(OM)在重症急性胰腺炎(SAP)肠黏膜屏障损害中的作用及其机制。

方法: 采用L-精氨酸(1 750 mg/kg)腹腔注射制备SAP大鼠模型。将80只Wistar大鼠随机分为Control组、OM对照组、SAP对照组、OM治疗组1、12、24、36、48 h 5个亚组, 每组10只。分时取材, 测定血浆内毒素、D-乳酸, 用荧光定量PCR方法检测结肠黏膜组织跨膜蛋白Claudin-1 mRNA表达, 用Western blot检测结肠黏膜组织Claudin-1蛋白水平。

结果: Control组与OM对照组相比较, 提示OM干预对正常大鼠血浆内毒素含量、D-乳酸水平和结肠黏膜组织Claudin-1 mRNA、蛋白表达没有统计学的差异。SAP对照组与Control组相对比, 大鼠血浆内毒素含量、D-乳酸浓度均显著升高($0.61 \text{ EU/mL} \pm 0.01 \text{ EU/mL}$ vs $0.05 \text{ EU/mL} \pm 0.02 \text{ EU/mL}$; $8.38 \text{ mg/L} \pm 0.38 \text{ mg/L}$ vs $2.87 \text{ mg/L} \pm 0.50 \text{ mg/L}$, 均 $P < 0.01$), 结肠黏膜组织Claudin-1 mRNA、蛋白表达显著降低。与SAP对照组比较, OM干预可显著上调结肠黏膜组织Claudin-1 mRNA、蛋白表达, 降低血浆内毒素、D-乳酸浓度($0.09 \text{ EU/mL} \pm 0.02 \text{ EU/mL}$ vs $0.61 \text{ EU/mL} \pm 0.01 \text{ EU/mL}$; $2.94 \text{ mg/L} \pm 0.42 \text{ mg/L}$ vs $8.38 \text{ mg/L} \pm 0.38 \text{ mg/L}$, 均 $P < 0.01$)。

结论: SAP损伤导致血浆内毒素、D-乳酸浓度升高, 结肠黏膜组织Claudin-1 mRNA、蛋白表达降低, OM干预可明显减少血浆内毒素、D-乳酸的产生, 上调结肠黏膜组织Claudin-1表达, 改善肠黏膜屏障功能, 阻止细菌移位。

关键词: 氧化苦参碱; 重症急性胰腺炎; 肠黏膜屏障; Claudin-1

张志强, 王燕庆, 董明, 崔建春, 荣大庆, 董齐. 氧化苦参碱诱导跨膜蛋白Claudin-1表达在重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜损害中的作用. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 510-514
http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/510.asp

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)常涉及多器官衰竭、败血症, 是临床极其棘手的疾病之一。如何有效地防治急性胰腺炎时肠黏膜屏障损伤, 肠黏膜通透性增强引起的细菌

移位是目前还没有解决的难题。

肠黏膜上皮细胞间的紧密连接, 形成了机体防止肠道内细菌发生移位的机械屏障^[1,2]。最近报道, 在炎症肠病、肠道感染时, 由于紧密连接崩解导致肠黏膜屏障断裂破坏, 引起肠上皮细胞旁通透性增加^[3-5]。紧密连接包含众多蛋白复合体, 可以调节细胞旁的通透性, 其中跨膜蛋白Claudin-1最具代表性^[6,7]。

本研究通过检测结肠黏膜组织Claudin-1的动态变化, 探讨氧化苦参碱(oxymatrine, OM)对SAP肠道黏膜的保护作用及作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 OM购自西安冠宇生物技术有限公司, L-精氨酸购自张家港市思普生化有限公司, D-乳酸检测试剂盒购自Megazyme, Rabbit Anti-CLDN1购自北京博奥森生物技术有限公司, 显色基质酶试剂盒购自厦门市酶试剂实验厂有限公司; 健康成年♂ Wistar大鼠80只(体质量250-280 g)购自中国医科大学实验动物部; 电泳系统DYY-10C、凝胶成像系统WD-9413B型购自北京六一, PCR仪Life Express购自杭州BIOER, 紫外分光光度计NANO 2000、超微量分光光度计NANO DROP 2000购自美国Thermo, 酶标仪Elx-800购自美国BioTek。

1.2 方法 将80只大鼠随机分为Control组($n = 10$), OM对照组($n = 10$), SAP对照组($n = 10$), OM治疗组($n = 50$), OM治疗组又分为建模治疗后1、12、24、36、48 h, 5个亚组(每亚组10只)。

1.2.1 动物实验: 在室温20℃-28℃、相对湿度40%-70%的动物房内适应性喂养1 wk后开始实验, 实验前12 h起禁食, 不控制饮水。Control组: 10只大鼠分2次腹腔注射生理盐水(与L-精氨酸溶液等量、间隔1 h); 48 h后处死; OM对照组: 10只大鼠, 给予OM(50 mg/kg)直肠保留灌肠(灌肠后把大鼠吊起, 头向下, 治疗8 min, 每24 h 1次); 48 h后处死。SAP对照组: 10只大鼠分2次腹腔注射L-精氨酸溶液(各175 mg/100 g、间隔1 h)^[8-10], 48 h后处死; OM治疗组: 分为建模治疗后1、12、24、36、48 h 5个亚组(每亚组10只), 50只大鼠分2次腹腔注射L-精氨酸溶液(各175 mg/100 g、间隔1 h), 第2次注射L-精氨酸后1 h开始给予OM(50 mg/kg)直肠保留灌肠治疗(灌肠后把大鼠吊起, 头向下, 治疗8 min, 每24 h 1次), 治疗后1、12、24、36、48 h处死相应亚组大鼠; 上述各组处死后的大鼠, 取门静脉血及结肠黏

■创新盘点

通过研究氧化苦参碱对重症急性胰腺炎动物模型进行灌肠干预, 解析了氧化苦参碱阻止细菌移位的作用机制, 揭示了氧化苦参碱通过靶向调控蛋白Claudin-1限制大肠上皮细胞旁间隙通透性的机制, 为预防和治疗重症急性胰腺炎继发肠黏膜屏障损害提供了新途径。

■应用要点

SAP损伤导致血浆内毒素、*D*-乳酸浓度升高, 结肠黏膜组织Claudin-1 mRNA、蛋白表达降低, OM干预可明显减少血浆内毒素、*D*-乳酸的产生, 上调结肠黏膜组织Claudin-1表达, 改善肠黏膜屏障功能, 阻止细菌移位。

表 1 Claudin-1引物

引物名称	序列(5'-3')	引物长度(bp)	退火温度(°C)
CLDN1-F	GTGCATGAGGTGCTTAGAAG	20	57.8
CLDN1-R	CACGTAGTCTTTCCCAGTAG	20	57.8

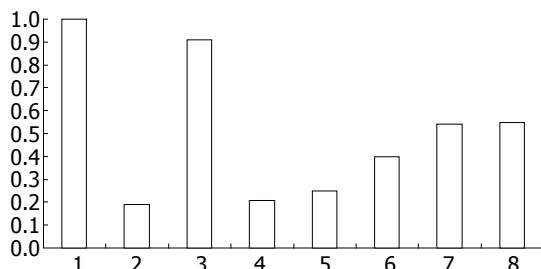


图 1 大鼠结肠黏膜组织中Claudin-1表达变化。1: Control组; 2: SAP对照组; 3: OM对照组; 4-8: OM治疗组1、12、24、36、48 h亚组。

膜组织固定保存。

1.2.2 *D*-乳酸、血浆内毒素水平及Claudin-1 mRNA表达水平的检测: 取结肠黏膜组织2 cm×2 cm, 采用TIANGEN公司总RNA提取试剂盒提取样本总RNA, 利用紫外分光光度计对提取的RNA浓度进行测定, 利用TIANScript cDNA第一链合成试剂盒对上步实验所得的RNA样本进行反转录以得到对应的cDNA; 建立PCR反应体系(引物信息见表1), 设计PCR反应程序, 利用韩国BIONEER公司生产的Exicycler™ 96荧光定量仪进行荧光定量分析, 应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析数据, 根据数据表得到各样本中基因的相对表达量。用Western blot检测结肠黏膜组织Claudin-1水平: 取结肠黏膜组织3 cm×3 cm, 4 °C匀浆, 加入蛋白提取液12 000 r/min离心10 min, 取上清液, 以考马斯亮蓝法进行蛋白定量。再将提取的蛋白等量加样, 经SDS-PAGE电泳分离样品后, 转膜封闭, 然后加入一抗(Rabbit Anti-Occludin, 浓度1:500)37 °C孵育1.5 h, 加入标记二抗(羊抗兔酶标二抗, 浓度1:10 000)37 °C孵育40 min。ECL浸膜显色, 暗室中, 取胶片于暗盒中曝光, 将胶片于成像系统中拍照, 保存图片。通过计算目的条带及内参条带的灰度比确定各个样本目的蛋白的表达量。

统计学处理 所有数据均以mean±SD表示, 采用单因素方差分析, 经SPSS11.0统计分析软件对数据进行处理。

2 结果

2.1 血浆内毒素含量和*D*-乳酸水平变化 Control

表 2 血浆内毒素、*D*-乳酸的变化 (mean ± SD)

分组	血浆	
	内毒素(EU/mL)	<i>D</i> -乳酸(mg/L)
Control组	0.05 ± 0.02	2.87 ± 0.50
OM对照组	0.08 ± 0.02	3.14 ± 0.58
SAP对照组	0.61 ± 0.01	8.38 ± 0.38
OM治疗组		
1 h亚组	0.69 ± 0.01	8.74 ± 0.42
12 h亚组	0.18 ± 0.02	5.61 ± 0.53
24 h亚组	0.16 ± 0.01	5.34 ± 0.50
36 h亚组	0.09 ± 0.01	4.07 ± 0.99
48 h亚组	0.09 ± 0.02 ^b	2.94 ± 0.42 ^b

^b*P*<0.01 vs SAP对照组。

组与OM对照组对比提示OM干预对正常大鼠血浆内毒素含量和*D*-乳酸水平没有统计学的改变。SAP对照组与Control组对比提示大鼠血浆中内毒素含量、*D*-乳酸浓度均较Control组显著升高。与SAP对照组比较OM治疗48 h后血浆内毒素含量、*D*-乳酸浓度显著降低(内毒素: 0.61 EU/mL ± 0.01 EU/mL vs 0.09 EU/mL ± 0.02 EU/mL, *P*<0.01; *D*-乳酸浓度: 8.38 mg/L ± 0.38 mg/L vs 2.94 mg/L ± 0.42 mg/L, *P*<0.01, 表2)。

2.2 结肠黏膜组织中Claudin-1 mRNA表达变化 Control组与OM对照组对比提示OM对正常大鼠结肠黏膜Claudin-1 mRNA表达没有统计学的改变。SAP对照组与Control组对比提示大鼠结肠黏膜Claudin-1 mRNA表达较Control组显著降低。

与SAP对照组比较OM治疗12 h后可显著提高结肠黏膜组织Claudin-1 mRNA表达, 并依时间顺序逐步增强(图1)。

2.3 结肠黏膜组织中Claudin-1蛋白表达变化 Control组与OM对照组对比提示OM对正常大鼠结肠黏膜Claudin-1蛋白表达没有统计学的改变。SAP对照组与Control组对比提示大鼠结肠黏膜Claudin-1蛋白表达较Control组显著降低。

与SAP对照组比较OM治疗后1、12、24 h结肠黏膜组织Claudin-1蛋白表达逐步增强, 之后达到均衡状态(图2)。

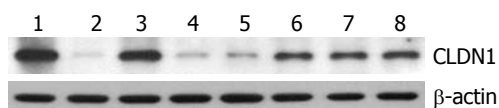


图2 Western blot示大鼠结肠黏膜组织Claudin-1的表达. 1: Control组; 2: SAP对照组; 3: OM对照组; 4-8: OM治疗组1、12、24、36、48 h亚组.

3 讨论

SAP发病凶险, 并发症多, 近年来其救治成功率有所提高, 但病死率仍为12%-15%. SAP患者第一死亡高峰是在发病1 wk内, 原因主要是全身炎症反应综合征导致的多器官衰竭; 第二死亡高峰是在患病1 wk后, 由于继发感染引发败血症所致. SAP的继发感染主要因素是结肠内常驻细菌移位^[11,12], 统计资料显示继发感染导致患者死亡占SAP总死亡率的80%^[13].

肠道黏膜屏障由机械屏障、免疫屏障、化学屏障、生物屏障组成, SAP时上述4种屏障均会受到不同程度地损伤. 肠道黏膜机械屏障是肠黏膜4种屏障最重要的一道屏障, 肠黏膜上皮细胞层的完整性及上皮细胞间的紧密连接, 形成了机体防止肠道内细菌发生移位的机械屏障^[1,2]. 正常情况下肠上皮细胞旁间隙是由蛋白复合体封闭, 而由蛋白复合体构成的紧密连接位于细胞侧膜的表层近顶端. 最近报道, 在炎性肠病、肠道感染时, 由于紧密连接崩解导致肠黏膜屏障断裂破坏, 引起肠上皮细胞旁通透性增加^[3-5]. 紧密连接包含众多蛋白复合体, 其主要有跨膜蛋白Occludin、Claudins、连接黏附分子(junctional adhesion molecule, JAM)和胞质附着蛋白Zos、AF6、7H6等蛋白紧密连接所组成^[14,15]. Claudin-1最具代表性, 这些蛋白复合体被认为可以调节细胞旁的通透性^[6,7].

OM是从我国传统中药苦豆子中提取的一种生物碱, 具有抗乙型和丙型肝炎病毒、改善肝细胞功能、抗肝纤维化、免疫调节、抗炎、抗肿瘤、抗过敏反应、抗心律失常、强心、降压、平喘等多种生物活性^[16-19], 目前临床上主要用于慢性乙型和丙型肝炎的治疗. 近年来, 有研究显示静脉应用OM联合应用善得定在SAP治疗上有协同作用, 疗效优于单一的西药治疗^[20], OM还能够抑制中性粒细胞趋化因子和单核细胞趋化蛋白在SAP大鼠胰腺组织中的表达, 对SAP有一定的治疗作用^[21,22].

本研究结果显示, OM治疗对正常结肠黏膜无损伤, 而能阻碍SAP诱发的血浆内毒素、D-乳酸浓度升高, 上调结肠黏膜组织Claudin-1

mRNA、蛋白表达.

SAP对照组与Control组对比大鼠血浆内毒素含量、D-乳酸浓度均较Control组显著升高, 提示存在肠黏膜屏障损伤, 肠黏膜通透性增加; 结肠黏膜组织Claudin-1 mRNA、蛋白表达显著降低, 提示结肠组织黏膜组织损伤, 紧密连接遭到破坏. 给予OM灌肠治疗后, OM治疗组5个亚组血浆内毒素含量、D-乳酸浓度逐步降低, 结肠黏膜组织Claudin-1基因和蛋白表达逐步提高. 这说明OM有助于肠黏膜屏障损伤的修复, 改善肠黏膜通透性, 抑制肠道细菌移位.

4 参考文献

- 范立侨, 徐保利, 李勇. 重症急性胰腺炎时肠屏障破坏的机制及防治. 国际外科学杂志 2007; 34: 319-322
- 陈玉梅, 冯志杰. 急性胰腺炎肠道功能障碍的发病机制与治疗. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1643-1648
- Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, Hansen W, Bleich A, Bruder D, Franzke A, Rogler G, Suerbaum S, Buer J, Gunzer F, Westendorf AM. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One* 2007; 2: e1308
- Rees LE, Cogan TA, Dodson AL, Birchall MA, Bailey M, Humphrey TJ. *Campylobacter* and IFN γ interact to cause a rapid loss of epithelial barrier integrity. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 303-309
- Oshima T, Sasaki M, Kataoka H, Miwa H, Takeuchi T, Joh T. Wip1 protects hydrogen peroxide-induced colonic epithelial barrier dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 3139-3147
- Bücker R, Troeger H, Kleer J, Fromm M, Schulzke JD. *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *J Infect Dis* 2009; 200: 756-764
- Li Q, Zhang Q, Wang C, Liu X, Li N, Li J. Disruption of tight junctions during polymicrobial sepsis in vivo. *J Pathol* 2009; 218: 210-221
- Dawra R, Sharif R, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Saluja AK. Development of a new mouse model of acute pancreatitis induced by administration of L-arginine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1009-G1018
- 满晓华, 赵航, 徐克群, 龚燕芳, 高军, 杜奕奇, 许爱芳, 李兆申. L-精氨酸诱导实验性慢性胰腺炎大鼠模型的可行性分析. 中华胰腺病杂志 2009; 9: 109-111
- 张明仪, 肖春琦, 沈文律, 周昌艳, 何新卫, 郑重. L-精氨酸诱导大鼠暴发型胰腺炎模型建立. 中华实验外科杂志 2008; 25: 1663-1664
- Sakorafas GH, Lappas C, Mastoraki A, Delis SG, Safioleas M. Current trends in the management of infected necrotizing pancreatitis. *Infect Disord Drug Targets* 2010; 10: 9-14
- Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 464-471
- Al Mofleh IA. Severe acute pancreatitis: pathogenetic aspects and prognostic factors. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 675-684
- Qin H, Zhang Z, Hang X, Jiang Y. L. plantarum prevents enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight

同行评价

本文新颖性较好, 具有一定的科学价值.

- junction proteins changes in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol* 2009; 9: 63
- 15 Severson EA, Kwon M, Hilgarth RS, Parkos CA, Nusrat A. Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) influences epithelial barrier function by regulating occludin, claudin-1 and E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 397: 592-597
- 16 Liu Y, Zhang XJ, Yang CH, Fan HG. Oxymatrine protects rat brains against permanent focal ischemia and downregulates NF-kappaB expression. *Brain Res* 2009; 1268: 174-180
- 17 刘浩, 仇毓东, 毛谅, 朱新华, 丁义涛. 苦参碱对大鼠小体积肝移植缺血再灌注损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1617-1621
- 18 陆丽华, 冉志华. 氧化苦参碱对人结肠癌细胞P21, P27, Cyclin E1及CDK2表达的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1353-1357
- 19 于晓峰, 邹健, 冉志华. 氧化苦参碱对人胃癌细胞杀伤作用的机制. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1719-1724
- 20 许永春, 冯青青, 李春安, 幸军, 樊拖迎, 胡扬涛. 生长抑素联合氧化苦参碱治疗重症急性胰腺炎. *胰腺病学* 2005; 5: 147-149
- 21 李兆申, 许永春, 屠振兴, 施新岗. 急性坏死性胰腺炎早期胰腺组织趋化因子基因的表达及氧化苦参碱的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 979-983
- 22 吕建芳, 范恒, 沈霖, 寿折星, 庄雄. 氧化苦参碱对实验性结肠炎大鼠肠黏膜细胞因子和核因子- κ B p65表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2289-2294

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

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、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

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. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录.

c-Jun氨基末端激酶选择性抑制剂对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎的影响

赵翠娟, 王承党

赵翠娟, 内蒙古包头市包钢医院消化内科 内蒙古自治区包头市 014010

王承党, 福建医科大学附属第一医院消化内科 福建医科大学消化系疾病研究室 福建省福州市 350005

作者贡献分布: 王承党负责课题设计和论文审核; 实验实施和统计处理由赵翠娟完成。

通讯作者: 王承党, 教授, 主任医师, 研究生导师, 350005, 福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院消化内科, 福建医科大学消化系疾病研究室. wangcdhl@sina.com

电话: 0591-87982521

收稿日期: 2010-07-23 修回日期: 2010-12-30

接受日期: 2011-01-21 在线出版日期: 2011-02-18

Treatment with SP600125, a selective JNK inhibitor, down-regulates the levels of TNF- α in the intestinal mucosa and IL-6 in the serum of mice with DSS-induced ulcerative colitis

Cui-Juan Zhao, Cheng-Dang Wang

Cui-Juan Zhao, Department of Gastroenterology, Baogang Hospital, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Cheng-Dang Wang, Department of Gastroenterology & Laboratory for Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China

Correspondence to: Cheng-Dang Wang, Department of Gastroenterology & Laboratory for Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, Fujian Province, China. wangcdhl@sina.com

Received: 2010-07-23 Revised: 2010-12-30

Accepted: 2011-01-21 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To evaluate the influence of SP600125, a selective c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor, on the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the intestinal mucosa and interleukin-6 (IL-6) in the serum of mice with dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis (UC).

METHODS: Forty male C57BL/6 mice were randomly assigned to five groups: normal control group, model control group, low-dose SP600125 group, large-dose SP600125 group, and DMSO group. Except that the normal control group was

given distilled water, animals of other groups were given 3% DSS in drinking water for 7 days to induce acute intestinal inflammation. Mice of the low- and large-dose SP600125 groups also received intraperitoneal injection of SP600125, while the DMSO group received DMSO. All animals were sacrificed on day 8 after treatment. The disease activity index (DAI) and histological index (HI) were calculated, the expression of p-JNK and TNF- α in the intestinal mucosa was measured by immunohistochemistry, and the level of IL-6 in the serum was measured by ELISA.

RESULTS: On day 8 after DSS exposure, DAI and HI showed no significant difference between the model control group and DMSO group E (both $P > 0.05$) but were significantly higher in the model control group than in the normal control group (8.00 ± 1.41 vs 0.25 ± 0.16 ; 5.88 ± 0.99 vs 0.50 ± 0.93 , both $P < 0.01$). Although there was no significant difference in DAI between the low-dose SP600125 group and model control group ($P > 0.05$), DAI was significantly lower in the large-dose SP600125 group than in the model control group (4.38 ± 1.51 vs 8.00 ± 1.41 , $P < 0.01$). HI in the two SP600125 groups were significantly lower than those in the model control group (3.88 ± 1.46 vs 5.88 ± 0.99 ; 2.63 ± 0.74 vs 5.88 ± 0.99 , both $P < 0.01$). The levels of p-JNK and TNF- α in the intestinal mucosa and that of IL-6 in the serum were significantly higher in the model control than in normal control group (99.01 ± 10.75 vs 116.41 ± 10.46 ; 103.39 ± 11.09 vs 120.24 ± 10.67 ; 183.34 ± 25.87 vs 75.91 ± 20.27 , all $P < 0.01$), but were significantly lower in the two SP600125 groups than in the model control group (105.94 ± 10.93 vs 99.01 ± 10.75 ; 110.21 ± 11.05 vs 103.39 ± 11.09 ; 140.37 ± 32.07 vs 183.34 ± 25.87 ; 114.52 ± 11.06 vs 99.01 ± 10.75 ; 117.87 ± 11.00 vs 103.39 ± 11.09 ; 108.61 ± 20.34 vs 183.34 ± 25.87 , all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Treatment with SP600125 can down-regulate the expression of p-JNK and TNF- α in the intestinal mucosa and IL-6 in the serum of mice with experimental UC.

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)主要是以侵犯结肠黏膜且以溃疡为主的慢性非特异性炎症性疾病。多数学者认为, UC是由环境因素和微生物因素之间复杂地相互作用于遗传易感人群, 引起肠道免疫反应过度亢进, 导致结肠黏膜损伤所致。抑制促炎症性细胞因子的产生已成为目前治疗UC的一条新思路。

■同行评议者

张筱茵, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

■相关报道

Swantek等研究发现利用JNK缺失突变手段可以阻止TNF- α 的翻译过程。

Key Words: Ulcerative colitis; Dextran sulfate sodium; c-Jun N-terminal kinase; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-6

Zhao CJ, Wang CD. Treatment with SP600125, a selective JNK inhibitor, down-regulates the levels of TNF- α in the intestinal mucosa and IL-6 in the serum of mice with DSS-induced ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 515-518

关键词: 溃疡性结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; c-Jun氨基末端激酶; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-6

赵翠娟, 王承党. c-Jun氨基末端激酶选择性抑制剂对葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎的影响. *世界华人消化杂志* 2011; 19(5): 515-518

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/515.asp>

摘要

目的: 探讨c-Jun氨基末端激酶(JNK)选择性抑制剂SP600125对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的急性期溃疡性结肠炎小鼠结肠组织内肿瘤坏死因子(TNF) α 的表达情况及血清白介素(IL)-6含量的影响。

方法: 40只♂C57BL/6小鼠随机分成5组, 每组8只。正常对照组(A组)、DSS模型组(B组)、SP600125低剂量组(C组)、SP600125高剂量组(D组)、DMSO载体组(E组)。A组小鼠饮用蒸馏水7 d; B-E组小鼠饮用3% DSS水溶液7 d。C组和D组小鼠分别以低、高剂量SP600125腹腔内注射, E组只给SP600125的载体DMSO, 给药方式同前。造模及干预7 d后处死小鼠, 观察指标包括: 疾病活动指数(disease active index, DAI)、组织学损伤的评估(histological index, HI); 免疫组织化学法检测各组结肠黏膜p-JNK和TNF- α 的变化, ELISA检测血清IL-6的水平。

结果: 造模第8天, B与E组之间的各项检测指标的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$); B组的DAI、HI都明显高于A组(8.00 ± 1.41 vs 0.25 ± 0.16 ; 5.88 ± 0.99 vs 0.50 ± 0.93 , 均 $P<0.01$), C组的DAI与B组相比无显著性差异($P>0.05$), D组的DAI明显低于B组(4.38 ± 1.51 vs 8.00 ± 1.41 , $P<0.01$), C、D组的HI都明显低于B组(3.88 ± 1.46 vs 5.88 ± 0.99 ; 2.63 ± 0.74 vs 5.88 ± 0.99 , 均 $P<0.01$); B组结肠黏膜的p-JNK、TNF- α 及血清IL-6都明显高于A组(99.01 ± 10.75 vs 116.41 ± 10.46 ; 103.39 ± 11.09 vs 120.24 ± 10.67 ; 183.34 ± 25.87 vs 75.91 ± 20.27 , 均 $P<0.01$), 各项在C、D组中的水平都明显低于B组(105.94 ± 10.93 vs 99.01 ± 10.75 ; 110.21 ± 11.05 vs 103.39 ± 11.09 ; 140.37 ± 32.07 vs 183.34 ± 25.87 ; 114.52 ± 11.06 vs 99.01 ± 10.75 ; 117.87 ± 11.00 vs 103.39 ± 11.09 ; 108.61 ± 20.34 vs 183.34 ± 25.87 , 均 $P<0.01$)。

结论: SP600125通过下调p-JNK表达, 降低小鼠结肠黏膜促炎因子TNF- α 表达及血清IL-6的含量而发挥其干预作用。

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是以结肠黏膜溃疡为主的慢性非特异性炎性肠病, 异常免疫应答反应是其主要的病理生理学机制, 而细胞因子是介导活化的免疫细胞和非免疫细胞间相互作用的必需因子^[1]。c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)被磷酸化后可以使得许多参与炎症反应的细胞因子的基因表达^[2], 且在调节Th1/Th2免疫细胞的分化中起到重要作用^[3], 可能是UC发病过程的重要环节^[4]。本研究采用JNK选择性抑制剂SP600125抑制JNK的活化, 并检测小鼠结肠黏膜内的P-JNK以及促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和血清白介素-6(interferon-6, IL-6)的改变情况, 探讨SP600125对UC的干预作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂C57BL/6小鼠40只(体质量18-22 g)购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulphate, DSS)为美国MP Biomedicals公司产品; c-Jun氨基末端激酶选择性抑制剂SP600125为Sigma公司产品; p-JNK小鼠抗小鼠单克隆抗体(sc-6254)为美国Santa公司产品; TNF- α 兔抗小鼠多克隆抗体(PR-0078)为美国Proteintech pTGLAB公司产品。非生物素二步法免疫组织化学检测试剂盒(抗鼠、抗兔)、小鼠IL-6 ELISA试剂盒等为北京中杉公司产品。

1.2 方法 将小鼠按照体质量随机分为5组: 正常对照组(A组)、DSS模型组(B组)、低剂量SP组(C组)、高剂量SP组(D组)、DMSO组(E组)。B-E组小鼠连续自由饮用3%DSS溶液7 d, A组小鼠自由饮用蒸馏水。在给予3%DSS之前2 h开始, C组和D组小鼠腹腔内注射SP600125溶液(剂量分别为10 mg/kg、20 mg/kg), A组和B组腹腔内注射0.9%氯化钠溶液, E组腹腔内注射DMSO。第7天时处死小鼠, 取心脏血分离血清, ELISA法测定血清IL-6浓度; 参照Murano等^[5]方法获得疾病活动指数(disease active index, DAI); 在结肠病

■创新盘点

本文利用DSS成功建立UC模型后, 既检测了黏膜组织中的促炎因子(TNF- α), 也检测了血清中的促炎因子(IL-6), 并早期应用JNK选择性抑制剂SP600125干预小鼠JNK的活化, 检测小鼠结肠黏膜内的P-JNK以及促炎细胞因子TNF- α 和血清IL-6的改变情况。

表 1 各组DAI和HI的比较 (mean ± SD, n = 8)

分组	DAI	HI
A组	0.25 ± 0.16	0.50 ± 0.93
B组	8.00 ± 1.41 ^b	5.88 ± 0.99 ^b
C组	5.88 ± 1.64 ^{bd}	3.88 ± 1.46 ^{bf}
D组	4.38 ± 1.51 ^{bd}	2.63 ± 0.74 ^{bf}
E组	8.25 ± 1.39 ^b	5.75 ± 2.25 ^b

^b*P* = 0.000 vs A组; ^d*P* = 0.002, ^f*P* = 0.000 vs B组.

变最严重处取组织标本作冰冻切片, 进行p-JNK和TNF-α免疫组织化学染色, 按说明书程序进行, 设阴性对照; 并取组织作常规石蜡包埋、切片、HE染色, 参照Dieleman等^[6]方法计算组织学损伤的评估(histological index, HI).

统计学处理 数据以mean ± SD表示, Levene法方差齐性检验, 然后行单因素方差分析(ANOVA), 组间两两比较采用LSD-*t*(方差齐)或Tamhane's T2(方差不齐)法. 设 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为有显著性意义. 采用SPSS13.0统计软件.

2 结果

2.1 DAI和HI 实验期间无动物死亡. A组动物结肠黏膜正常; B组和E组黏膜结构损伤明显, 结肠黏膜不完整, 广泛黏膜糜烂、隐窝炎及脓肿形成, 大部分腺体被破坏, 腺管排列紊乱, 大量中性粒细胞浸润; C组和D组动物结肠黏膜改变相对较轻. A组-E组的DAI差异有显著性意义($P = 0.000$), 其中B-E组高于A组(均 $P < 0.01$), C、D组低于B组(均 $P < 0.01$), 而B组与E组间($P = 1.000$)、C组与D组间($P = 0.865$)的差异无统计学意义(表1). A组-B组的HI差异有统计学意义($P = 0.000$), 其中B组-E组HI均高于A组(均 $P < 0.01$), C组和D组的HI均低于B组(均 $P < 0.01$), 而B组与E组间($P = 0.805$)、C组与D组间的差异无统计学意义($P = 0.389$, 表1).

2.2 血清IL-6水平 A组-E组动物的血清IL-6浓度分别是: 75.91 μg/L ± 20.27 μg/L、183.34 μg/L ± 25.87 μg/L、140.37 μg/L ± 32.07 μg/L、108.61 μg/L ± 20.34 μg/L、182.40 μg/L ± 33.42 μg/L, 各组间差异有显著性意义($P = 0.000$), 其中B组和E组的IL-6浓度分别高于A组(均 $P = 0.000$), C组和D组分别低于B组($P = 0.003, 0.000$), 而B组和E组间、C组和D组间的差异无统计学意义($P = 0.945, 0.679$).

2.3 结肠p-JNK、TNF-α免疫组织化学染色 阳性

表 2 各组p-JNK、TNF-α的平均I4变化 (mean ± SD, n = 8)

分组	p-JNK	TNF-α
A组	116.41 ± 10.46	120.24 ± 10.67
B组	99.01 ± 10.75 ^b	103.39 ± 11.09 ^a
C组	105.94 ± 10.93 ^d	110.21 ± 11.05 ^c
D组	114.52 ± 11.06 ^d	117.87 ± 11.00 ^c
E组	98.99 ± 10.67 ^b	103.12 ± 10.84 ^a

^a*P* = 0.012, ^b*P* = 0.007 vs A组, ^c*P* = 0.021, ^d*P* = 0.009 vs B组.

染色均为细胞质或细胞膜棕黄色染色, 用JD801形态学显微图像分析系统计算灰度值(I4), I4越高则表示其表达水平越低. A组-E组间的p-JNK的平均I4差异有统计学意义($P = 0.000$). B组和E组的p-JNK的平均I4低于A组(均 $P = 0.000$); C组和D组的平均I4则高于B组(均 $P = 0.000$); A组、C组和D组3组之间, 以及B组与E组间的I4差异无统计学差异($P = 0.897, 0.963$). 各组结肠黏膜TNF-α的I4变化与p-JNK的变化相一致(表2).

3 讨论

本实验发现, 与A组相比, B组和E组的小鼠结肠黏膜内p-JNK的表达显著增高, 同时相应部位TNF-α表达及血清内IL-6浓度均明显增高; SP600125可以降低结肠黏膜内p-JNK的表达, 同时使结肠高表达的TNF-α及血清内浓度增高的IL-6都显著降低, DAI和病理炎症减轻.

大量实验证明细胞因子的调控和释放与JNK信号传导通路密切相关, 许多种胞外刺激因素磷酸化和活化JNK, 包括脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)、细胞因子和生长因子等, 活化后的JNK可以磷酸化c-Jun、c-fos、ATF2和ATF3等转录因子, 进而可以使许多参与炎症反应的细胞因子的基因表达, 如TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8等^[2,7]. Swantek等^[8]研究发现利用JNK缺失突变手段可以阻止TNF-α的翻译过程; 同样利用SP600125干预CD14⁺细胞后出现TNF-α mRNA半衰期明显缩短; 另外, 在细胞实验中, SP600125抑制JNK下游转录因子c-Jun的磷酸化后, 基因表达受到抑制的细胞因子还有COX-2、IFN-γ、ICAM-1、IL-1β、IL-2、IL-6和IL-8等^[9,10].

最近不断有研究表明JNK及其下游蛋白在一些慢性炎症情况中起到重要作用, 例如类风湿性关节炎^[11], 也有研究证明在UC患者以及DSS诱导的SD大鼠结肠炎模型的炎症性结肠组

■应用要点

JNK可能通过增加TNF-α、IL-6的表达而参与UC的发病过程, 早期应用JNK抑制剂SP600125可以通过对TNF-α、IL-6表达的抑制作用, 进而改善急性UC模型小鼠结肠组织损伤程度及临床表现, 因此JNK抑制剂SP600125具有潜在的临床应用价值.

■名词解释

JNKs: MAPK超家族成员之一, 属于进化上保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 也称作应激活化蛋白激酶(SAPKs).

■同行评价

本文设计合理, 具有一定的临床借鉴意义。

织内出现JNK的显著活化, 而且SP600125对于体外培养的UC患者结肠组织细胞及粒细胞中炎症因子的产生明显的抑制作用^[12]。

细胞因子可以促进细胞间的相互作用, 刺激抗原特异效应细胞的增殖, 介导局部和系统炎症反应, 是UC在对外界刺激的免疫性炎症反应中一个重要因素^[13]。UC患者肠道黏膜中大量分泌的TNF- α , 能激活多种免疫和炎症细胞而促进炎症形成; 还可以促进其他细胞因子的释放, 形成细胞因子网络, 扩大炎症连锁反应, 诱导结肠上皮细胞广泛凋亡、坏死脱落^[14]; 血清及肠道黏膜明显增高的IL-6与病变范围和病变严重程度呈正相关^[15]。本次实验中使用DSS建立的小鼠结肠炎模型中也出现结肠黏膜内高表达的TNF- α 以及血清IL-6浓度增高的表现。而在使用SP600125, 一种选择性JNK抑制剂, 其显著降低小鼠结肠炎模型的结肠黏膜内p-JNK的表达后, 结肠黏膜内高表达的TNF- α 以及血清内IL-6的表达都显著降低。这表明小鼠结肠炎模型的肠黏膜组织中存在JNK的激活, 阻断其可以减少细胞因子的产生。

总之, SP600125可以缓解DSS致急性UC小鼠模型肠黏膜组织病理炎性改变以及明显降低小鼠的疾病活动度, 其机制可能与SP600125阻断JNK的活化后, 从上游抑制了促炎因子TNF- α 、IL-6的表达, 说明JNK通过调控和释放促炎因子在UC的发病中起着重要的作用。而该信号传导通路在中其他成员在UC中的作用和地位将是我們进一步研究的。

4 参考文献

- Fantini MC, Monteleone G, Macdonald TT. New players in the cytokine orchestra of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1419-1423
- Hoffmann E, Ashouri J, Wolter S, Doerrie A, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, Wagner EF, Troppmair J, Mackman N, Kracht M. Transcriptional regulation of EGR-1 by the interleukin-1-JNK-MKK7-c-Jun pathway. *J Biol Chem* 2008; 283: 12120-12128
- Dong C, Yang DD, Wysk M, Whitmarsh AJ, Davis RJ, Flavell RA. Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. *Science* 1998; 282: 2092-2095
- Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2002; 168: 5342-5351
- Murano M, Maemura K, Hirata I, Toshina K, Nishikawa T, Hamamoto N, Sasaki S, Saitoh O, Katsu K. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 51-58
- Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Peña AS, Meuwissen SG, Van Rees EP. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 1998; 114: 385-391
- Kaneko M, Saito Y, Saito H, Matsumoto T, Matsuda Y, Vaught JL, Dionne CA, Angeles TS, Glicksman MA, Neff NT, Rotella DP, Kauer JC, Mal-lamo JP, Hudkins RL, Murakata C. Neurotrophic 3,9-bis[(alkylthio)methyl]-and-bis(alkoxymethyl)-K-252a derivatives. *J Med Chem* 1997; 40: 1863-1869
- Swanek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 6274-6282
- Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, Leisten JC, Motiwala A, Pierce S, Satoh Y, Bhagwat SS, Manning AM, Anderson DW. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13681-13686
- Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM, Firestein GS. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001; 108: 73-81
- Cha HS, Boyle DL, Inoue T, Schoot R, Tak PP, Pine P, Firestein GS. A novel spleen tyrosine kinase inhibitor blocks c-Jun N-terminal kinase-mediated gene expression in synoviocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317: 571-578
- Mitsuyama K, Suzuki A, Tomiyasu N, Tsuruta O, Kitazaki S, Takeda T, Satoh Y, Bennett BL, Toyonaga A, Sata M. Pro-inflammatory signaling by Jun-N-terminal kinase in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2006; 17: 449-455
- Monteleone G, Fina D, Caruso R, Pallone F. New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 361-364
- Louis E. The immuno-inflammatory reaction in Crohn's disease and ulcerative colitis: characterisation, genetics and clinical application. Focus on TNF alpha. *Acta Gastroenterol Belg* 2001; 64: 1-5
- Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005; 28: 187-196

编辑 李军亮 电编 李薇

不同类型自身免疫性肝病的组织学特征及ER α 、TGF- β 1表达的意义

李麟, 章明放, 王邦茂, 白雪, 张玉洁, 乌日丽其

李麟, 章明放, 天津医科大学病理教研室 天津市 300070
王邦茂, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052
白雪, 张玉洁, 天津医科大学总医院病理科 天津市 300052
乌日丽其, 内蒙古包头市肿瘤医院消化科 内蒙古自治区包头市 014030
作者贡献分布: 李麟与章明放对此文所作贡献均等; 此课题由章明放、王邦茂及李麟设计; 研究过程由李麟、章明放、王邦茂、白雪、张玉洁及乌日丽其共同操作完成; 研究所用分析工具由李麟提供; 数据分析由李麟完成; 本论文写作由李麟、章明放及王邦茂完成。
通讯作者: 章明放, 300070, 天津市, 天津医科大学病理教研室。lilin20073007@163.com
收稿日期: 2010-11-01 修回日期: 2011-01-07
接受日期: 2011-01-11 在线出版日期: 2011-02-18

Histological features and significance of ER α and TGF- β 1 expression among different types of autoimmune liver diseases

Lin Li, Ming-Fang Zhang, Bang-Mao Wang, Xue Bai, Yu-Jie Zhang, Wuriliqi

Lin Li, Ming-Fang Zhang, Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
Xue Bai, Yu-Jie Zhang, Department of Pathology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
Wuriliqi, Department of Gastroenterology, Tumor Hospital of Baotou, Baotou 014030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Correspondence to: Ming-Fang Zhang, Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China. lilin20073007@163.com
Received: 2010-11-01 Revised: 2011-01-07
Accepted: 2011-01-11 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To summarize the histological features of autoimmune hepatitis (AIH), primary biliary cirrhosis (PBC) and chronic virus hepatitis of type B (CHB), and to investigate the significance of ER α and TGF- β 1 expression in the above liver diseases.

METHODS: Histological examination was performed using liver biopsy specimens from 29

patients with AIH, 18 patients with PBC, and 15 patients with CHB. Immunohistochemistry was used to detect the expression of ER α and TGF- β 1 in the above specimens and 8 normal liver tissue specimens.

RESULTS: The incidences of feathery degeneration, bile thrombus, and bile duct hyperplasia were significantly different among AIH, PBC, and CHB (33.33% vs 3.45%, 6.67%; 44.44% vs 6.92%, 6.67%; 61.11% vs 34.48%, 13.33%; all $P < 0.05$). In patients with PBC, the expression of TGF- β 1 was significantly higher in the portal area than in the hepatic lobule (31.80 ± 15.92 vs 16.00 ± 6.28 , $P < 0.05$). The expression of TGF- β 1 in the portal area was significantly higher in PBC than in the other three groups (31.80 ± 15.92 vs 10.00 ± 12.15 , 13.44 ± 13.51 , 3.20 ± 3.20 , all $P < 0.01$). In normal controls, the expression of TGF- β 1 was significantly higher in the hepatic lobule than in the portal area (16.85 ± 3.48 vs 3.20 ± 3.20 , $P < 0.01$). The expression of ER α was significantly different among the four groups. The expression of ER α was significantly higher in AIH and PBC than in normal controls (94.78 ± 48.36 , 110.40 ± 36.66 vs 28.98 ± 24.60 , both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Different autoimmune liver diseases have different histological features. AIH is characterized by interface hepatitis, and PBC by destructive cholangitis. ER α and TGF- β 1 may mediate and promote the development and progression of autoimmune liver diseases.

Key Words: Autoimmune liver disease; Histological features; Immunohistochemistry; Estrogen receptor α ; Transforming growth factor- β 1

Li L, Zhang MF, Wang BM, Bai X, Zhang YJ, Wuriliqi. Histological features and significance of ER α and TGF- β 1 expression among different types of autoimmune liver diseases *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 519-523

摘要

目的: 比较自身免疫性肝炎(AIH)、原发性胆

■背景资料

自身免疫性肝病的详细发病机制未明, 不同类型的自身免疫性肝病各自的组织学特征是明确诊断的重要依据。有研究表明ER α 在自身免疫性肝病中起重要作用, 而与其密切关联的TGF- β 等细胞因子在肝细胞损伤过程中的作用日益受到关注。

■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

■相关报道

王国辉等研究表明,在大鼠胆管损伤狭窄模型中损伤狭窄组TGF- β 1表达高于正常组。

胆汁性肝硬化(PBC)及慢性乙型肝炎(CHB)的组织学特征,并探讨雌激素受体 α (ER α)及转化生长因子 β 1(TGF- β 1)在各组肝活检中的表达及意义。

方法:应用HE染色对29例I型AIH、18例PBC、15例CHB肝穿标本进行组织学特征分析,应用免疫组织化学方法检测各组ER α 及TGF- β 1的表达情况,设8例正常肝组织(非肝病患者尸检来源的肝组织)为对照。

结果:各组肝活检组织学特征中羽毛状变性、胆栓、胆管增生的发生率的差异具有统计学意义(33.33% vs 3.45%, 6.67%; 44.44% vs 6.92%, 6.67%; 61.11% vs 34.48%, 13.33%, 均 $P<0.05$)。TGF- β 1在PBC组汇管区的阳性细胞数高于肝小叶(31.80 ± 15.92 vs 16.00 ± 6.28 , $P<0.05$),各组间汇管区阳性细胞数PBC组高于其他3组(31.80 ± 15.92 vs 10.00 ± 12.15 , 13.44 ± 13.51 , 3.20 ± 3.20 , 均 $P<0.01$),在正常组肝小叶内阳性细胞数高于汇管区(16.85 ± 3.48 vs 3.20 ± 3.20 , $P<0.01$)。ER α 在各组的表达AIH和PBC组高于正常组(94.78 ± 48.36 , 110.40 ± 36.66 vs 28.98 ± 24.60 , 均 $P<0.01$)。

结论:不同类型的自身免疫性肝病的组织学特征有所不同,AIH以肝小叶界板的损伤为主要改变,而PBC以胆管上皮损伤为主要特征。ER α 及TGF- β 1可能介导和促进了自身免疫性肝病的发生发展。

关键词:自身免疫性肝病;组织学特征;免疫组织化学;雌激素受体 α ;转化生长因子 β 1

李麟,章明放,王邦茂,白雪,张玉洁,乌日丽其.不同类型自身免疫性肝病的组织学特征及ER α 、TGF- β 1表达的意义.世界华人消化杂志 2011; 19(5): 519-523
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/519.asp>

0 引言

自身免疫性肝病的病因及发病机制仍未阐明。该病多见于女性^[1],本实验检测雌激素受体 α (estrogen receptor, ER α)在该病的表达情况来探讨是否ER α 与该病发病机制存在关联。转化生长因子(transforming growth- β 1, TGF- β 1)与肝纤维化密切相关,本实验检测其在各组肝组织中表达情况来比较其是否有所不同并初步探讨其在自身免疫性肝病发病中的作用。自身免疫性肝病包括自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH),原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC),原发性硬化性胆管炎(primary

sclerosing cholangitis, PSC)及重叠综合征(overlap syndrome, OS),由于后两者发病率低,本文主要比较AIH、PBC与CHB的组织学特征。

1 材料和方法

1.1 材料 收集天津医科大学总医院病理科2007-2009年的肝穿刺蜡块标本,其中AIH 29例,男4例,女25例,年龄35-74岁;PBC 18例,男2例,女16例,年龄33-76岁;CHB 15例,男11例,女4例,年龄16-62岁;正常肝组织8例(非肝病患者尸检来源的肝组织)为对照组,男5例,女3例,年龄38-53岁。自身免疫性肝病的诊断参照1999年国际AIH小组(IAIHG)修正的AIH临床评分标准^[2],慢性乙型肝炎诊断按照2000年中华医学会传染病与寄生虫病分会及肝病学会联合修订的慢性乙型肝炎诊断标准。

1.2 方法 每例标本均经10%中性甲醛固定,常规石蜡包埋。4 μ m连续切片分别进行HE染色和免疫组织化学染色(操作按照试剂盒说明进行)。兔抗TGF- β 1多克隆抗体、兔抗ER α 单克隆抗体及SP试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。免疫组织化学结果判定,选取5个高倍视野计数阳性细胞数取其平均值。

统计学处理 计量资料以mean \pm SD表示,采用SPSS13.0软件进行组间资料的单因素方差分析及SNK法进行两两比较,组内资料进行配对 t 检验,并对分类变量资料进行 χ^2 检验, $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 3组肝组织学特征比较 AIH、PBC、CHB 3组中羽毛状变性发生率分别为3.45%、33.33%、6.67%,PBC组明显高于AIH组($P<0.05$);桥接坏死发生率分别为27.59%、50.00%、13.33%,PBC组明显高于乙肝组($P<0.05$);胆栓发生率分别为6.92%、44.44%、6.67%,PBC组明显高于AIH和CHB组($P<0.01$, $P<0.05$);胆管增生发生率分别为34.48%、61.11%、13.33%,PBC组明显高于AIH和CHB组($P<0.05$, 表1)。

2.2 ER α 表达 ER α 表达在肝细胞核为棕黄色颗粒(图1),AIH组高于正常组($P<0.01$),PBC组高于正常组($P<0.01$, 表2)。

2.3 TGF- β 1表达 TGF- β 1在肝KC、肝窦内皮细胞、HSC细胞及单核细胞的胞质内表达(图2),在肝小叶和汇管区分别计数,组内比较PBC

表 1 各组肝组织组织学特征比较 (n)														
分组	n	浆细胞	嗜酸性粒细胞	羽毛状变性	肝细胞嗜酸性变	花环	界面炎	桥接坏死	肝细胞淤胆	胆栓	纤维化	假小叶	肝硬化	胆管增生
AIH	29	16	12	1	17	9	18	8	7	2	16	10	10	10
PBC	18	13	7	6 ^a	9	5	14	9 ^c	9	8 ^{bc}	8	8	8	11 ^c
CHB	15	4	1	1	4	2	5	2	3	1	5	3	3	2

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs AIH组, ^c $P<0.05$ vs CHB组.

表 2 ER α 在各组肝组织中的表达		
分组	n	阳性细胞数
AIH	12	94.78 \pm 48.36 ^b
PBC	10	110.40 \pm 36.66 ^b
CHB	8	68.77 \pm 61.01
正常组	8	28.98 \pm 24.60

^b $P<0.01$ vs 正常组.

表 3 TGF- β 1在各组肝组织中的表达			
分组	n	肝小叶内阳性细胞数	汇管区阳性细胞数
AIH	12	14.49 \pm 8.38	10.00 \pm 12.15 ^b
PBC	10	16.00 \pm 6.28	31.80 \pm 15.92
CHB	8	17.06 \pm 3.89	13.44 \pm 13.51 ^b
正常组	8	16.85 \pm 3.48	3.20 \pm 3.20 ^b

^b $P<0.01$ vs PBC组.

组汇管区阳性细胞数高于肝小叶阳性细胞数 ($P<0.05$), 正常组肝小叶阳性细胞数高于汇管区阳性细胞数 ($P<0.01$); 组间肝小叶阳性细胞数差异无统计学意义 ($P>0.05$); 组间汇管区阳性细胞数比较PBC组高于AIH组、CHB组及正常组 ($P<0.01$, 表3).

3 讨论

AIH和PBC是两种不同的自身免疫性肝病, 已知AIH因抑制性T淋巴细胞的缺陷而导致免疫调节的紊乱和自身抗体的产生而致, PBC是自身抗体和T淋巴细胞介导的细胞毒效应所导致的胆管上皮破坏, 但其详细发病机制尚未阐明^[3,4]. CHB是由乙型肝炎病毒引起的肝损伤. 不同类型肝炎的鉴别诊断是临床迫切需要解决的难题. 尽管已有多种组织学改变的表述, 但多为病变发展到相当程度时的表现, 且各种病变欠缺绝对特异性, 各型病变异同点在早、中期难以界定.

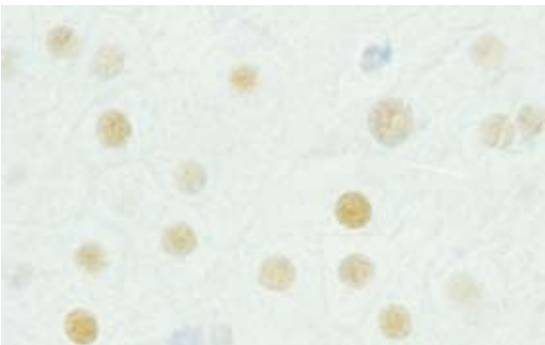


图 1 ER α 在肝细胞核的表达(免疫组织化学染色 $\times 400$).

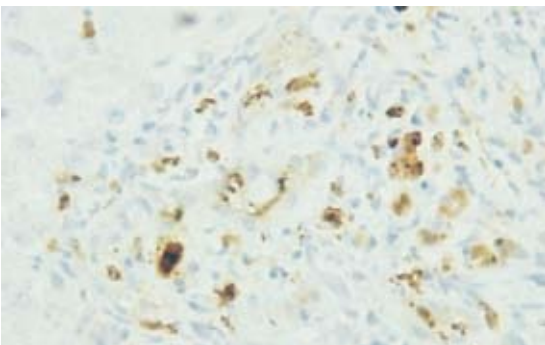


图 2 TGF- β 1在肝KC、肝窦内皮细胞、HSC细胞及单核细胞胞质的表达(免疫组织化学染色 $\times 400$).

本文尝试从不同的组织学变化梳理诊断的思路. 已知羽毛状变性和胆管增生在PBC中常见, 本实验PBC组的羽毛状变性、桥接坏死、胆栓和胆管增生显著高于其他组. 花环结构和浆细胞浸润及界面炎是AIH的特征^[5], 本研究也显示, 浆细胞浸润、界面炎、肝细胞嗜酸性变、纤维化及假小叶在AIH和PBC组较CHB组尽管没有显著性差异但呈增高趋势, 可能由于各组例数所限或病变程度差异难以反映出病变的全貌, 有必要收集更多的例数, 探究不同阶段病变的特性和动态性变化, 为明确诊断提供更有力的证据.

雌激素能够调节人和动物的免疫系统, 影响T淋巴细胞和B淋巴细胞的增殖和活性, 引起相应的免疫状态变化. 雌激素的作用部分或全部

■应用要点
本文将组织学改变与ER α 及TGF- β 1表达差异作为探索思路, 阐明组织学特征与相应标记物的关系将为临床诊治开辟新的思路.

■同行评价

本文对自身免疫性肝病的治疗有一定的参考价值,但可读性一般.

依赖于ER, ER影响T淋巴细胞的分化成熟, 且是B淋巴细胞形成所必需. 已证实雌激素与自身免疫性疾病有关, 如雌激素缺乏所致T淋巴细胞功能缺陷是形成干燥综合征自身免疫性组织缺损的重要原因, 此外, 给遗传性易患自身免疫性疾病的小鼠注射雌激素, 可加速小鼠表达自身抗体, 最后发展成淋巴腺病、关节炎、免疫复合性肾小球肾炎而死亡. 女性占系统性红斑狼疮绝大多数, 服用含雌激素避孕药的妇女常致病情恶化, 提示雌激素在促进自身免疫性反应和引起该病发生时起重要作用. 但雌激素与ER是否和自身免疫性肝病有关, 报道尚少. 有研究表明, 在女性PBC患者ER α 基因多态性影响T淋巴细胞亚群的转换及细胞因子的表达^[6]. Alvaro等^[7]研究ER α 表达在胆管细胞, 与本实验ER α 在肝细胞表达不同, 但与其较正常肝组织中表达显著增高的结论一致, 提示ER α 在自身免疫性肝病的发病中起到促进作用, 但详细机制有待深入探讨.

TGF- β 是肝纤维化发生中的重要因子, 见于肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC), 还见于角质细胞(keratinocyte, KC)、肝窦内皮细胞和肝纤维化区域的炎细胞. 其还可由辅助性T淋巴细胞的另一个亚群-Th3细胞(也称为调节性T淋巴细胞)分泌^[8]. 近年来发现TGF- β 对细胞的生长、分化和免疫功能都有重要的调节作用, 是一类极强的免疫调节剂, 可抑制免疫活性细胞如T、B淋巴细胞、胸腺细胞、NK细胞、淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK细胞)的增殖及细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte)的产生, 调节细胞表型, 抑制淋巴细胞的分化, 抑制一些因子产生. TGF- β 1可抑制自身免疫性疾病进展, 如类风湿性关节炎^[9]和自身免疫性胰腺炎^[10]. 相反, 对自身抗体起主要作用的重症肌无力症^[11], TGF- β 1可使其加重. 在免疫球蛋白E(immunoglobulin E)抗体引起的哮喘病患者中, TGF- β 1可增加疾病的严重程度^[12]. 有研究表明TGF- β 1在自身免疫及肝纤维化方面发挥重要的作用, 但其在自身免疫性肝病中的作用研究不多, 有学者建议把敲出TGF- β 1基因的小鼠作为PBC的模型^[13], 可见TGF- β 1在自身免疫性肝病的发病机制中起到了一定作用. 王国辉等^[14]研究表明在大鼠胆管损伤狭窄模型中损伤狭窄组TGF- β 1表达高于正常组, 本研究发现在汇管区内TGF- β 1的表达PBC组高于其他3组, 而PBC主要是以胆管损伤为特点, 所以此结论与上述研究一致. 本研究还发现

在PBC组汇管区的TGF- β 1表达高于肝小叶内, 可能是因为汇管区的炎症较重、HSC增生显著并且常伴纤维化所致. 在正常组却相反, 肝小叶内表达高于汇管区, 可能因为正常肝组织汇管区内炎症轻微且没有纤维化, 所以大部分表达在肝小叶内. 另外还有学者研究其在PBC III-IV期患者血清中的含量是降低的^[15], 又有学者检测其在AIH患者血清中含量是增高的^[16], 本研究只检测其在肝组织中的表达, 是否与血中其含量存在相关性还有待于进一步探讨.

雌激素、ER、TGF- β 1与T淋巴细胞及B淋巴细胞之间的关联近年来受到关注, 雌激素减少导致TGF- β 1的下降, 而TGF- β 1的下降导致T淋巴细胞的数量和活性明显增加, 而T淋巴细胞活化后产生的肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素等细胞因子有可能在肝细胞的损伤过程发挥重要作用. 其详细机制有待本课题组深入研究.

4 参考文献

- 1 弓艳霞, 王邦茂. I型自身免疫性肝炎分析102例. 世界华人消化杂志 2008; 16: 322-325
- 2 Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Edleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Büschenfelde KH, Zeniya M. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999; 31: 929-938
- 3 陈嵩, 王宇明. 自身免疫重叠综合征. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1875-1878
- 4 邱德凯, 李新民, 马雄. 原发性胆汁性肝硬化-自身免疫性肝炎重叠综合征30例诊断和治疗分析. 胃肠病学 2004; 9: 340-343
- 5 闪海霞, 吴爱华, 侯金林, 朱幼美. 自身免疫性肝病的临床与病理学特点分析. 临床肝胆病杂志 2008; 24: 111-113
- 6 Zhang Y, Chen WZ, Shi JM. [Effect of estrogen receptor alpha gene polymorphism on the variations of T lymphocyte subsets and its related cell factors in female patients with primary cholestasis cirrhosis]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2010; 18: 740-744
- 7 Alvaro D, Invernizzi P, Onori P, Franchitto A, De Santis A, Crosignani A, Sferri R, Ginanni-Corradini S, Mancino MG, Maggioni M, Attili AF, Podda M, Gaudio E. Estrogen receptors in cholangiocytes and the progression of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2004; 41: 905-912
- 8 Kitani A, Chua K, Nakamura K, Strober W. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *J Immunol* 2000; 165: 691-702
- 9 Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, Kuruvilla AP, Hardison AM, Palladino MA. Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 7375-7379

- 10 Peng Y, Laouar Y, Li MO, Green EA, Flavell RA. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4572-4577
- 11 Shi FD, Bai XF, Xiao BG, van der Meide PH, Link H. Nasal administration of multiple antigens suppresses experimental autoimmune myasthenia gravis, encephalomyelitis and neuritis. *J Neurol Sci* 1998; 155: 1-12
- 12 Duvernelle C, Freund V, Frossard N. Transforming growth factor-beta and its role in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2003; 16: 181-196
- 13 Kikuchi K, Tanaka A, Matsushita M, Kitazawa E, Hosoya N, Kawashima Y, Selmi C, Gershwin ME, Miyakawa H. Genetic polymorphisms of transforming growth factor beta-1 promoter and primary biliary cirrhosis in Japanese patients. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1110: 15-22
- 14 王国辉, 蒋桂星, 崔云甫, 胡占良. TGF- β 1在大鼠胆管损伤修复过程中的表达. *世界华人消化杂志* 2010; 18: 502-505
- 15 Voumvouraki A, Koulentaki M, Tzardi M, Sfakianaki O, Manousou P, Notas G, Kouroumalis E. Increased TGF- β 3 in primary biliary cirrhosis: an abnormality related to pathogenesis? *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5057-5064
- 16 Sakaguchi K, Kitano M, Nishimura M, Senoh T, Ohta T, Terao M, Shinji N, Koide N, Tsuji T. Serum level of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and the expression of TGF-beta receptor type II in peripheral blood mononuclear cells in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 1780-1783

编辑 李薇 电编 李薇

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》正文要求

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

^{18}F -FDG PET/CT对显像阳性原发性肝癌 ^{125}I 粒子植入治疗疗效价值的评估

张冰, 李鹤平, 王晓燕, 杨建勇, 陈伟, 林润, 沈俊杰

■背景资料

原发性肝癌起病隐匿, 发现时多已失去手术切除机会, 其姑息治疗目前存在多种手段, ^{125}I 放射性粒子植入作为治疗手段之一, 近年来在国内不断开展, 其治疗后影像学评价也日益受到重视。

张冰, 李鹤平, 杨建勇, 陈伟, 林润, 沈俊杰, 中山大学附属第一医院介入放射科 广东省广州市 510080

王晓燕, 中山大学附属第一医院PET/CT中心 广东省广州市 510080

国家自然科学基金面上项目, No. 30600156; 30870692

作者贡献分布: 张冰与李鹤平对此文所作贡献均等; 此项研究经费由杨建勇与李鹤平提供; 课题设计由李鹤平与张冰共同完成; 资料统计由张冰、林润及沈俊杰共同完成; 数据分析及论文写作由张冰完成; 李鹤平、杨建勇、陈伟及王晓燕提供指导。

通讯作者: 李鹤平, 副教授, 510080, 广东省广州市, 中山大学附属第一医院介入放射科. jxgdhp@hotmail.com

收稿日期: 2010-11-06 修回日期: 2010-12-24

接受日期: 2010-12-29 在线出版日期: 2011-02-18

Role of ^{18}F -FDG PET/CT in the surveillance of primary liver cancer treated by ^{125}I seed implantation

Bing Zhang, He-Ping Li, Xiao-Yan Wang,
Jian-Yong Yang, Wei Chen, Run Lin, Jun-Jie Shen

Bing Zhang, He-Ping Li, Jian-Yong Yang, Wei Chen, Run Lin, Jun-Jie Shen, Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China
Xiao-Yan Wang, PET/CT Center, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30600156; 30870692

Correspondence to: Associate Professor He-Ping Li, Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. jxgdhp@hotmail.com

Received: 2010-11-06 Revised: 2010-12-24

Accepted: 2010-12-29 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To determine the role of ^{18}F fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography (^{18}F -FDG PET/CT) in the surveillance of primary liver cancer treated by ^{125}I seed implantation.

METHODS: A total of 39 patients with primary liver cancer (55 lesions) whose ^{18}F -FDG PET/CT scan was positive underwent PET/CT 2 months after ^{125}I seed implantation. Imaging findings were compared with the results of radiological follow-up.

■同行评议者

袁友红, 副教授,
湖南省人民医院
科研部

RESULTS: There were 21 lesions with and 34 without residual viable tumor tissue which were confirmed by conventional radiological examinations at the implantation sites. In contrast, 19 lesions with and 31 without residual viable tumor tissue were identified on ^{18}F -FDG PET/CT. The diagnostic sensitivity and specificity of ^{18}F -FDG PET/CT were 90.4% and 91.2%, respectively.

CONCLUSION: In patients with primary liver cancer whose ^{18}F -FDG PET/CT scan is positive, PET/CT is a valuable method to assess the viability of tumor after ^{125}I seed implantation.

Key Words: Primary liver cancer; ^{125}I seed; ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography

Zhang B, Li HP, Wang XY, Yang JY, Chen W, Lin R, Shen JJ. Role of ^{18}F -FDG PET/CT in the surveillance of primary liver cancer treated by ^{125}I seed implantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 524-528

摘要

目的: 探讨 ^{18}F -FDG PET/CT对显像阳性的原发性肝癌行 ^{125}I 粒子植入治疗疗效价值的评价。

方法: 原发性肝癌患者39例, 共55个肿瘤病灶, 均于放射性 ^{125}I 粒子植入治疗前确定病灶为 ^{18}F -FDG PET/CT显像阳性; 放射性 ^{125}I 粒子植入治疗后2 mo行PET/CT检查评价疗效, 之后进行常规影像学(CT或MR)随访6 mo, 随访结果作为肿瘤病灶是否有治疗后残留的标准。

结果: 55个肿瘤病灶中常规影像学(CT或MR)随访6 mo证实有肿瘤残留的病灶为21个, 其中19个放射性 ^{125}I 粒子植入治疗后2 mo行PET/CT评价为有残留, 另外2个PET/CT评价为无残留; 随访6 mo证实无肿瘤残留的病灶34个, 其中31个放射性 ^{125}I 粒子植入治疗后2 mo行PET/CT评价为无残留, 另外3个PET/CT评价为有残留。 ^{18}F -FDG PET/CT在判断肿瘤残留方面的灵敏度和特异度分别为90.4%, 91.2%。

结论: ^{18}F -FDG PET/CT对显像阳性的原发性肝癌 ^{125}I 粒子植入后坏死灶与残留灶的区分有较高的灵敏度和特异度, 能够较好地评价疗效, 并能为进一步治疗提供指导作用。

关键词: 原发性肝癌; ^{125}I 粒子; ^{18}F -FDG PET/CT

张冰, 李鹤平, 王晓燕, 杨建勇, 陈伟, 林润, 沈俊杰. ^{18}F -FDG PET/CT对显像阳性原发性肝癌 ^{125}I 粒子植入治疗疗效价值的评估. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 524-528
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/524.asp>

0 引言

原发性肝癌起病隐匿, 发现时多已处于中晚期, 失去手术切除机会. 目前对此类患者的治疗方法主要包括经导管动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)、消融治疗(射频、微波、酒精、冷冻、高强度聚焦超声)等^[1]. 对于血供不丰富行TACE效果欠佳, 而且位置特别如位于膈顶, 胆管、门静脉等重要管道结构旁不适合行消融治疗的部分肝癌病灶, ^{125}I 放射性粒子植入作为一种有效补充综合治疗手段, 具有局控率高、创伤小的特点, 在临床已经得到较广泛应用^[2-5].

放射性粒子植入后的疗效评价关系到进一步治疗方案的制定, 本文通过对39例原发性肝癌患者(共有 ^{18}F -FDG PET/CT显像阳性的55个病灶)行 ^{125}I 放射性粒子植入后, ^{18}F -FDG PET/CT检查结果与常规影像学(CT或MR)随访6 mo实际结果的对比分析, 判断PET/CT在评价粒子植入治疗疗效及寻找肿瘤残留灶中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 患者入选条件: (1)选取经影像检查(CT、MR、超声), 甲胎蛋白以及乙型肝炎病史等确诊的原发性肝癌患者, 含初发和部分外科术后复发患者, 部分经穿刺活检或手术病理检查证实; (2)肝癌病灶、肝功能等情况不适合或患者拒绝行外科切除手术或肝脏移植; (3)需要治疗及评价的肝癌病灶血供不丰富, 经评估或已经行经导管动脉化疗栓塞效果欠佳, 而且病灶位置特别如位于膈顶, 胆管、门静脉等重要管道结构旁经评估不适合行消融治疗; (4)肝功能Child-Pugh分级A-B级, 患者预期生存时间 ≥ 6 mo; (5)需要治疗及评价的肝癌病灶于粒子植入术前 ^{18}F -FDG PET/CT检查病灶为阳性显像(放射性浓聚); (6)所有患者均知情同意. 入选患者及病灶情况: 2008-09/2010-03入选符合条件患者

39例, 其中男31例, 女8例, 年龄41-75(平均 56 ± 8)岁, 接受研究的病灶(行放射性 ^{125}I 粒子植入治疗及 ^{18}F -FDG PET/CT评价疗效)每个患者有1-3个, 病灶总数55个, 病灶直径2-5(平均 3.4 ± 0.9) cm. 放射性粒子治疗计划系统(treatment planning system, TPS)及粒子植入器械由珠海和佳医疗设备有限公司提供; ^{125}I 放射性粒子由北京智博高科生物技术有限公司提供, 采用 ^{125}I 钛合金管密封籽源, 为 $4.5 \text{ mm} \times 0.3 \text{ mm}$ 的圆柱体, 平均粒子源活度为 $0.78(0.73-0.81) \text{ mCi}$, 半衰期为60.1 d, 粒子释放27.4 keV和31.4 keV的X射线及35.5 keV的 γ 射线(主要为 γ 射线); 采用Toshiba Asteion螺旋CT引导穿刺操作并植入粒子. PET/CT检查采用Philips公司Gemini GXL-16型PET/CT扫描仪, 显像剂为 ^{18}F -FDG, 由IBA公司Cyclone-10型医用回旋加速器和正电子放射性药品自动合成模块生产, 放化纯度 $>95\%$. CT检查采用Toshiba Aquilion 64层螺旋CT; MR检查采用Siemens公司Magnetom Trio Tim 3.0T超导MR成像仪。

1.2 方法

1.2.1 放射性 ^{125}I 粒子植入治疗: 术前CT扫描判断肿瘤范围, 根据扫描结果利用TPS系统判断最佳进针点及所需粒子数目, 根据治疗计划在CT引导下植入 ^{125}I 放射性粒子, 将穿刺针以 $0.8-1.0 \text{ cm}$ 的间隔平行插入肿瘤内部, 确定位置合适后, 拔出针芯, 装上粒子植入枪, 再以 $0.8-1.0 \text{ cm}$ 的间距顺序地逐一植入, 使粒子在瘤体内均匀排布. 术后止血、抗炎、止痛等对症处理. 全部病灶共植入粒子484颗, 每个病灶最少3颗, 最多52颗, 术前计划肿瘤匹配周缘剂量(matched peripheral dose MPD)为50-150 Gy.

1.2.2 PET/CT检查与疗效评价: 放射性 ^{125}I 粒子植入治疗后2 mo行 ^{18}F -FDG PET/CT检查, 肿瘤丧失活性或坏死表现为放射性摄取明显减低或放射性缺损, 肿瘤残留表现为放射性浓聚. 以上图像分析诊断均经PET/CT中心两位医生各自单独阅片完成。

1.2.3 随访: 所有接受研究的患者均于 ^{125}I 放射性粒子植入治疗2 mo后行 ^{18}F -FDG PET/CT检查, 之后按常规每4-8 wk进行常规影像学(CT或MR)随访, 共随访6 mo, 每个患者随访3-6次. CT或MR平扫和动态增强检查: 存在典型“快进快出”影像表现的区域及虽靶病灶无上述典型影像表现但范围扩大, 均评价为肿瘤有残留; 靶病灶未见明显强化区提示肿瘤丧失活性或坏死评价肿瘤无残留; 以上诊断均经放射科两位医生

■ 相关报道

畅智慧等利用PET/CT评价肝恶性肿瘤介入治疗疗效, 他们认为PET/CT有助于诊断传统影像学不能明确的肝内复发或新发病灶, 并能同时有效地发现肝外病灶. 赵明等研究认为原发性肝癌经TACE联合射频消融治疗以及手术后, PET/CT对判断肿瘤残留以及根据检查结果知道射频消融治疗较CT有更大优势。

■应用要点

PET/CT作为一种形态与功能相结合的影像手段,对于早期发现肝癌 ^{125}I 放射性粒子植入治疗后肿瘤残留具有较高的灵敏度和特异度。

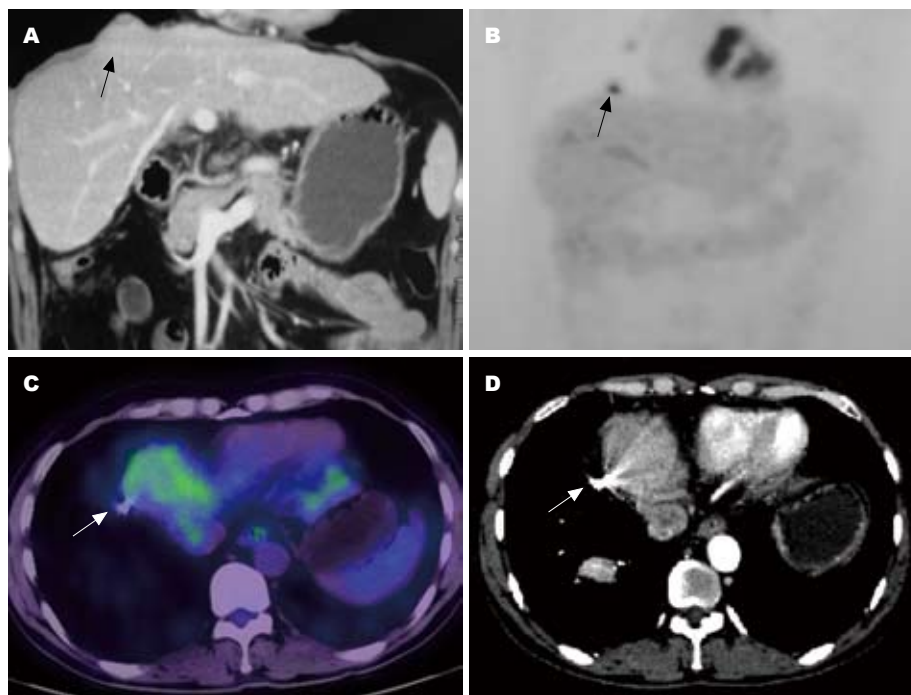


图1 原发性肝癌患者近膈顶转移灶行放射性粒子 ^{125}I 植入术。A: 术前病灶位置; B: 术前PET最大密度投影(MIP)图像示相应病灶显像阳性(高代谢); C: 粒子植入术后2 mo, PET/CT示病灶代谢与肝脏本底接近, 认为病灶灭活; D: CT随访复查病灶未见异常强化或病灶扩大, 证实PET/CT评价结果。

各自单独阅片完成。 ^{125}I 放射性粒子植入治疗2 mo后行 ^{18}F -FDG PET/CT检查评价为肿瘤有残留的病灶, 按以下原则处理: (1)如果范围较小, 继续随访观察; (2)如果范围较大, 立即行粒子植入补充治疗, 治疗后影像学复查(CT或MR)发现强化灶消失, 推断前一次治疗后为肿瘤有残留。

本研究以粒子植入治疗的肿瘤病灶为靶病灶, 肝内外其他病灶在本文中不做研究。

2 结果

55个肿瘤病灶中常规影像学(CT或MR)随访6 mo证实有肿瘤残留的病灶为21个, 其中19个放射性 ^{125}I 粒子植入治疗后2 mo行PET/CT评价为有残留, 另外2个PET/CT评价为无残留; 随访6 mo证实无肿瘤残留的病灶34个, 其中31个放射性 ^{125}I 粒子植入治疗后2 mo行PET/CT评价为无残留, 另外3个PET/CT评价为有残留。 ^{18}F -FDG PET/CT在判断肿瘤残留方面的灵敏度和特异度分别为90.4%、91.2%。典型病例见图1。

3 讨论

放射性粒子 ^{125}I 能够持续释放27.4、31.4 keV的X射线和35.5 keV的 γ 射线(主要为 γ 射线), 其通过射线对DNA分子链的影响(单链断裂、双链断裂)及射线与水分子产生的氧自由基, 破坏肿瘤细胞的生物大分子, 进而杀灭肿瘤。其在组织内有效半径约1.7 cm, 植入后, 放射源处于瘤体内, 达到高度适形, 局部治疗剂量高, 周围正常组织受影响小, 再加上持续照射(半衰期为60.1 d), 使

肿瘤的再增殖减少, 生物效应提高。部分学者^[6-8]通过动物实验研究表明肿瘤组织中央靠近粒子处为凝固性坏死区, 距籽源稍远处为变性坏死的肿瘤细胞, 但远离粒子处由于照射不足肿瘤细胞继续增殖。这些继续增殖肿瘤细胞就成为残留或复发的根源, 治疗后影像学评价就在于判断靶病灶的坏死及残留情况。

PET/CT是一种将代谢显像和解剖影像融合的检查手段, ^{18}F -FDG(氟代脱氧葡萄糖)是目前临床上应用最广泛的正电子显像剂, 结构与葡萄糖相似, 仅葡萄糖2位碳原子上的羟基被 ^{18}F 取代, 其代谢形成的磷酸化产物6-PO4- ^{18}F -DG较长时间滞留于细胞内, 滞留量基本与体内组织细胞葡萄糖消耗一致, 能够反映体内葡萄糖代谢情况^[9]。肿瘤细胞分裂增殖加快, 葡萄糖代谢水平通常较高, 使得6-PO4- ^{18}F -DG逐渐聚集在肿瘤细胞内, 在PET图像上表现为肿瘤病灶放射性异常浓聚, 融合CT图像, 可对肿瘤部位、范围、代谢活跃程度可做出判断。对于治疗后的肿瘤, 形态变化往往迟于代谢变化, 早期即可通过监测肿瘤组织代谢的变化判别坏死与存活的残余瘤组织, 理论上肿瘤坏死区域放射性放射性摄取明显减低或放射性缺损, 而残留区域因瘤细胞继续增殖而代谢增高。

对于原发性肝癌, PET/CT诊断有一定局限性, 文献报道 ^{18}F -FDG PET/CT的诊断敏感性为50%-65%^[10,11]。这主要与原发性肝癌细胞分化程度有关, 分化差的肝癌病灶, 表现为放射性高浓

聚,此类肝癌细胞内葡萄糖-6-磷酸酶浓度或表达相对较低,¹⁸F-FDG滞留较多,而分化较好的肝癌病灶则表现与肝脏本底放射性分布相同或更低,导致假阴性^[12,13]。由于残留的肝癌组织的生物学特性一般与原病灶相同,原病灶的分化程度也就决定了PET/CT成像的敏感性。本研究患者粒子植入术前先行¹⁸F-FDG PET/CT检查,以术前¹⁸F-FDG PET/CT显像阳性(放射性浓聚)的患者作为研究对象,一方面避免了肿瘤分化程度不同对结果判断产生的影响,另一方面避免了显像阴性患者不必要的重复检查。所以对于¹⁸F-FDG PET/CT显像阳性的患者,其在判断肿瘤残留方面的灵敏度和特异度远高于原发性肝癌诊断的敏感性,这些残留灶发现后并能及时补充治疗。而对于¹⁸F-FDG PET/CT显像阴性的患者,因其肿瘤病灶的放射性摄取无法从肝脏本底中区分出来,不建议利用其作为疗效评价工具。

目前对于¹²⁵I放射性粒子植入治疗原发性肝癌,最常用的评价手段为CT平扫和动态增强扫描,其主要以是否存在强化来判断肿瘤的残留情况。但是,肿瘤的强化受诸多因素影响:比如部分肝癌并不表现为典型的“快进快出”强化征象;另外,由于放射性粒子的金属特性,行此治疗的病灶会因为金属伪影的存在,影响到肿瘤及周边强化情况的判断;还有部分大肝癌患者在TACE基础上行粒子植入补充治疗,加上高密度碘油的干扰,更影响强化区域观察。因此,上述各种因素的存在会干扰判断肿瘤的活性区域判断,进而导致假阴性。PET/CT则能很好地解决上述问题,因为PET图像只反映糖代谢的活跃程度,而不受肿瘤强化方式差异及金属伪影的干扰,CT图像用来定位,虽仍存在伪影却不影响结果判断。这些因素决定了PET/CT作为疗效评价工具具有较大的优势。本研究结果亦显示¹⁸F-FDG PET/CT在¹²⁵I放射性粒子植入治疗原发性肝癌后判断肿瘤残留方面的灵敏度和特异度分别高达90.4%、91.2%,是一种较好的评价方法。另外,PET/CT作为一项较全面的检查手段,不但可以评价接受治疗的靶病灶,而且可以发现同时存在的肝内外新发病灶^[14],为下一步治疗方案制定提供指导。

本文中¹⁸F-FDG PET/CT评价存在2例假阳性及3例假阴性。假阳性可能与治疗后肿瘤周围炎症反应有关,局部炎性细胞代谢旺盛,导致FDG摄取增高。吴湖炳等^[15]研究发现肿瘤残留病

灶的FDG浓聚程度高于炎症反应,且与治疗前病灶相近,而炎性反应性浓聚则低于治疗前病灶,可将二者鉴别开。而对于肝癌放射性粒子植入治疗后是否符合上述结论,尚需较大病例的验证。假阴性则可能与放射性粒子近距离照射使肝癌细胞在特定细胞周期生长阻滞^[16,17]有关,此时肿瘤细胞代谢减低,显像阴性,但在放射性解除后部分未凋亡肿瘤细胞继续生长,代谢增加。

总之,PET/CT作为一种将功能与形态结合的影像检查手段,对于显像阳性的原发性肝癌患者行¹²⁵I放射性粒子植入治疗后进行疗效评价,能够较好的区分肿瘤坏死及残留灶,有利于指导进一步治疗,与其他常规影像手段相比具有明显的优势。

4 参考文献

- 1 刘蒙,董卫国.原发性肝癌非手术治疗的研究进展.世界华人消化杂志 2009; 17: 1224-1228
- 2 罗开元,郑江华,李波,邵庆华,杨国凯,赵泉,杨嵘. ¹²⁵I粒子永久性植入组织间放射治疗肝癌.肝胆胰外科杂志 2004; 16: 29-31
- 3 徐静,梅铭惠,陈谦,杨景红,邱维佳.术中组织间植入¹²⁵I粒子治疗肝恶性肿瘤.中华实验外科杂志 2005; 22: 368-369
- 4 陈开运,向国安,王汉宁,肖方联.粒子植入放疗联合肝动脉化疗栓塞治疗肝癌的临床研究.中华放射肿瘤学杂志 2007; 16: 447-450
- 5 张福军,李传行,吴沛宏,李奎,黄金华,范卫君,张亮,顾仰葵,卢鸣剑,吴月霞,王俊杰.肝癌肝移植术后复发及肝外转移瘤的¹²⁵I粒子植入治疗.中华医学杂志 2007; 87: 956-959
- 6 程宝兴,吴浩荣,刘增礼,张志勇,陈伟,孙亦晖,王浩伟,陶桂珍. ¹²⁵I粒子组织间植入治疗小鼠H22原位移植性肝癌.中华核医学杂志 2006; 26: 241-244
- 7 欧超,韦长元,杨伟萍,李挺.组织间植入¹²⁵I粒子诱导H22肝肿瘤细胞凋亡的研究.中华实验外科杂志 2007; 24: 797-799
- 8 邵文博,韩建奎,宋金龙,丛宁. ¹²⁵I粒子植入治疗荷人肝癌裸鼠移植瘤的实验研究.中华核医学杂志 2006; 26: 23-25
- 9 李天然,陈自谦,郑春雨.临床PET/CT诊断学.第1版.北京:人民军医出版社,2008: 61
- 10 Hain SF, Fogelman I. Recent advances in imaging hepatocellular carcinoma: diagnosis, staging and response assessment: functional imaging. Cancer J 2004; 10: 121-127
- 11 Sun L, Wu H, Guan YS. Positron emission tomography/computer tomography: challenge to conventional imaging modalities in evaluating primary and metastatic liver malignancies. World J Gastroenterol 2007; 13: 2775-2783
- 12 Khan MA, Combs CS, Brunt EM, Lowe VJ, Wolverton MK, Solomon H, Collins BT, Di Bisceglie AM. Positron emission tomography scanning in the evaluation of hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2000; 32: 792-797
- 13 潘中允,屈婉莹,周诚,刘仁贤. PET/CT诊断学.第1版.北京:人民卫生出版社,2009: 589
- 14 Kuker RA, Mesoloras G, Gulec SA. Optimization of

■同行评价

本文可读性和创新性较好,具有较好的科学价值。

- FDG-PET/CT imaging protocol for evaluation of patients with primary and metastatic liver disease. *Int Semin Surg Oncol* 2007; 4: 17
- 15 吴湖炳, 王全师, 黄祖汉, 赵件兰, 王明芳, 康世均. 用 18F-FDG PET显像评价恶性肿瘤射频消融术疗效. 中华核医学杂志 2003; 23: 153-155
- 16 宋金龙, 邵文博, 唐宪民. 125I粒子近距离照射治疗原发性肝癌的实验研究. 肿瘤防治杂志 2005; 12: 750-752
- 17 邵文博, 宋金龙. 125I粒子近距离照射对BEL-7402肝癌细胞增殖和细胞周期的影响. 中国医学物理学杂志 2005; 22: 563

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》外文字符标准

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

肝门部胆管癌Bismuth分型与经内镜胆道塑料支架引流术后并发症及退黄效果之间的关系

章诺贝, 黄年根

章诺贝, 黄年根, 南昌大学第二附属医院消化科 江西省南昌市 330006

作者贡献分布: 资料的收集、分析与论文撰写由章诺贝完成; 研究过程由黄年根指导.

通讯作者: 黄年根, 主任医师, 教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院消化科. huangniangen@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-09-24 修回日期: 2010-12-27

接受日期: 2011-01-06 在线出版日期: 2011-02-18

Relationship of hilar cholangiocarcinoma Bismuth type with incidence of complications of endoscopic retrograde cholangiopancreatography and jaundice clearance

Nuo-Bei Zhang, Nian-Gen Huang

Nuo-Bei Zhang, Nian-Gen Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Professor Nian-Gen Huang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. huangniangen@yahoo.com.cn

Received: 2010-09-24 Revised: 2010-12-27

Accepted: 2011-01-06 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To evaluate the relationship of hilar cholangiocarcinoma Bismuth type with incidence of complications of endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERBD) and jaundice clearance.

METHODS: Ninety-seven patients with inoperable hilar cholangiocarcinoma were treated by ERBD. The differences in the incidence of cholangitis, pancreatitis, bleeding, and the rate of jaundice clearance were compared among different types of hilar cholangiocarcinoma.

RESULTS: Patients with Bismuth types III and IV hilar cholangiocarcinoma had a significantly higher incidence of post-ERBD cholangitis (59.52% vs 3.33%; 59.52% vs 4.00%, both $P < 0.01$)

and a lower rate of jaundice clearance (71.43% vs 96.67%; 71.43% vs 100.00%, both $P < 0.01$) than those with Bismuth types I and II disease. However, there were no significant differences in the incidences of post-ERBD pancreatitis and bleeding among all types of hilar cholangiocarcinoma ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Bismuth types III and IV hilar cholangiocarcinoma is associated with a significantly higher risk of post-ERBD cholangitis and a lower rate of jaundice clearance.

Key Words: Hilar cholangiocarcinoma; Bismuth type; Endoscopic retrograde cholangiopancreatography; Complications; Jaundice clearance

Zhang NB, Huang NG. Relationship of hilar cholangiocarcinoma Bismuth type with incidence of complications of endoscopic retrograde cholangiopancreatography and jaundice clearance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 529-532

摘要

目的: 评估肝门部胆管癌Bismuth分型与经内镜胆道塑料支架引流术(ERBD)术后并发症及退黄效果之间的关系.

方法: 收集已确诊为肝门部胆管癌、且不能或不愿接受外科治疗的, 在南昌大学第二附属医院消化科行ERBD的患者. 分析各型肝门部胆管癌之间在行ERBD术后胆管炎、胰腺炎、出血发生率以及退黄效果的差异.

结果: Bismuth III型和IV型肝门部胆管癌ERBD术后胆管炎发生率显著高于Bismuth I型和II型(59.52% vs 3.33%; 59.52% vs 4.00%, 均 $P < 0.01$), 而退黄有效率相对较低(71.43% vs 96.67%; 71.43% vs 100.00%, 均 $P < 0.01$); 术后胰腺炎和出血的发生率在各型中无显著性差异(均 $P > 0.05$).

结论: 肝门部胆管癌Bismuth III型和IV型在ERBD术后更易并发胆管炎, 且术后退黄效果

■背景资料

肝门部是胆管癌的好发部位, 其部位隐蔽, 早期诊断困难, 同时由于其解剖空间狭窄, 治疗棘手, 并且由于肿瘤的生物学特性, 很难做到根治性切除. 随着手术技艺的进步, 针对不同分型、分期肝门部胆管癌的联合肝切除的广泛应用提高了手术切除率, 但总的疗效仍不满意, 5年存活率 $< 10\%$, 手术切除率 $< 20\%$, 80%以上的患者仍须接受包括ERBD在内的姑息性治疗.

■同行评议者

张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

■相关报道

Vienne等近期在GIE上发表题为“预测采用内镜下支架放置术对恶性肝门部狭窄的引流效果:肝体积评估的作用”一文中指出ERCP术前通过横断面的影像学数据对于肝容积分布的评估能够优化内镜操作,从而得到更好的退黄效果并有效减少术后胆管炎的发生。

不够理想。

关键词: 肝门部胆管癌; Bismuth分型; 经内镜胆道塑料支架引流术; 并发症; 退黄

章诺贝, 黄年根. 肝门部胆管癌Bismuth分型与经内镜胆道塑料支架引流术后并发症及退黄效果之间的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 529-532

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/529.asp>

0 引言

Soehendra等^[1]在1980年首先报道应用塑料支架治疗胆道梗阻,随着治疗性内镜下逆行胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)的不断发展和塑料支架制作材料及工艺的不断提高和完善,经内镜胆道塑料支架引流术(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)在国内外已广泛应用于良、恶性胆道梗阻的治疗,然而,无论是诊断性还是治疗性ERCP均是微创或有创性技术,其并发症的发生在一定程度上是难以避免的,如:胆管炎、胰腺炎、出血、穿孔等.为进一步了解ERBD在治疗肝门部胆管癌应用中的价值,现收集南昌大学第二附属医院2004-01/2009-12行ERBD治疗肝门部胆管癌共97例,对肝门部胆管癌Bismuth分型与ERBD术后并发症及退黄效果之间的关系进行评估。

1 材料和方法

1.1 材料 本文统计已确诊为肝门部胆管癌、且不能或不愿接受外科治疗的,在南昌大学第二附属医院消化科行ERBD的患者共97例.男65例,女32例;年龄39-86(平均64.5)岁.全部患者均伴有不同程度的黄疸.97例患者根据Bismuth分型分成A、B、C 3组,其中A组为Bismuth I型共30例,肿瘤局限于肝总管,未侵犯汇合部及左、右肝管;B组为Bismuth II型共25例,肿瘤自肝总管侵犯左、右肝管汇合部;C组为Bismuth III型和IV型共42例(因本研究中Bismuth IV型患者仅为11例,故将其与Bismuth III型患者归为一组进行分析),III型为肿瘤自肝总管侵犯单侧一级肝管分支,其中包括IIIa和IIIb 2个亚型,IIIa型侵犯右肝管,IIIb型侵犯左肝管,IV型为肿瘤同时侵犯肝总管和左右肝管. FUJINON ED-450XT5电子十二指肠镜, 450 cm Wilson-Cook斑马导丝, OLYMPUS乳头切开刀, ERBE ICC80高频电发生器, Wilson-Cook 8.5F胆道塑料引流支架,

Wilson-Cook支架推送器。

1.2 方法 术前准备同常规ERCP,借助磁共振胰胆管成像(magnetic resonance cholangiopancreatography, MRCP)初步判定胆道梗阻部位以选择拟引流区域,常规乳头插管,采用以导丝引导下的选择性胆管插管,如遇插管困难,则行乳头括约肌预切开术(endoscopic pre-cut sphincterotomy, EPS).在X线监视下,使用多种方法使导丝越过狭窄段胆管,超选至扩张最明显引流范围最广泛的胆管,抽取胆汁后缓慢注入造影剂,进一步以确认肿瘤Bismuth分型并选择合适长度的支架,循导丝引入支架推送器置入支架.针对部分ERBD术不成功及术后退黄无效者改用经皮经肝胆道穿刺引流术(percutaneous transhepatic cholangiography drainage, PTCD),同时行支架置入,有胆系感染患者,在PTCD 1 wk-1 mo后行二期胆道支架置入。

术后2-24 h测血淀粉酶值高于正常的4-5倍,可确认为高淀粉酶血症,在此基础上若有典型的上腹部疼痛,即可确诊为胰腺炎^[2].在术后2 wk内观察有无胆管炎发生,通过对其他原因无法解释的寒战、右上腹痛、体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$ 、白细胞和C反应蛋白升高并结合超声或CT等影像学检查诊断胆管炎。

术后观察退黄疗效分为满意、一般、无效.满意:1 wk内总胆红素下降1/3以上,2 wk内下降50%以上;一般:1 wk内总胆红素下降不足1/3,2 wk内下降50%以下;无效:黄疸几无改变甚至上升,其中“满意”和“一般”为退黄有效^[3]。

统计学处理 对资料应用SPSS13.0统计软件进行处理,行 χ^2 检验,若经 χ^2 检验提示组间差异具有统计学意义,则运用 χ^2 分割法进一步分析. $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

A组30例均放置单根塑料支架,其中16人术前已行经内镜胆道金属支架引流术(endoscopic metal biliary endoprosthesis, EMBE),后金属支架再次堵塞;B组25例均在左右肝管放置双塑料支架;C组中9例因导丝无法通过狭窄段进入对侧肝管故放置单根支架,其余33例放置双侧支架。

A、B两组中各1例术后发生胆管炎,分别占各组3.33%和4.00%,此2例胆管炎在应用抗生素后在短期内被治愈. C组中25例(25/42, 59.52%)术后发生胆管炎,术后胆管炎发生率显著高于A、B两组($\chi^2 = 23.93, P<0.01$; $\chi^2 = 20.34$,

表1 各组肝门部胆管癌经内镜胆道塑料支架置入术后的结果 $n(\%)$

	A组($n = 30$)	B组($n = 25$)	C组($n = 42$)
胆管炎	1(3.33)	1(4)	25 ^b (59.52)
胰腺炎	2(6.67)	1(4)	2(4.76)
出血	0(0.00)	0(0)	2(4.76)
退黄有效	29(96.67)	25(100)	30 ^b (71.43)

^b $P < 0.01$ vs A, B组.

$P < 0.01$), 其中22例为放置双侧支架, 在应用抗生素后胆管炎被治愈; 其余3例为放置单支架, 占C组中放置单支架者的33.33%(3/9), 此3例患者经PTCD在对侧肝管中置入支架后胆管炎被治愈(表1)。

A组和C组中各有2例术后并发胰腺炎, 分别占各组6.67%和4.76%, B组中1例术后出现胰腺炎, 占本组4%, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.22$, $P > 0.05$)。此4例患者均为轻度胰腺炎, 通过内科治疗治愈。A、B组术后均无出现消化道出血, C组中有2例在EPS后出现迟发性出血, 占本组4.76%, 差异无统计学意义($\chi^2 = 2.84$, $P > 0.05$), 此2例在内镜下止血出血停止。以上3组病例中均未出现消化道穿孔(表1)。

A组中29例退黄有效(29/30, 96.67%), 1例无效(1/30, 3.33%), 此例经更换支架后黄疸消退; 全部B组均退黄有效(25/25, 100.00%); C组中30例退黄有效(30/42, 71.43%), 12例退黄无效(12/42, 28.57%), 支架置入后退黄有效率显著低于A、B两组($\chi^2 = 7.54$, $P < 0.01$; $\chi^2 = 8.71$, $P < 0.01$), 其中8例经PTCD置入支架后黄疸改善, 其余4例经PTCD置入支架后黄疸仍未改善, 其中3例为肝功能衰竭, 另1例因肝门部胆道梗阻情况异常复杂故影响胆汁引流效果(表1)。

3 讨论

肝门部胆管癌也称Klatskin瘤, 范围可累及左、右肝管至肝总管, 占胆管癌的50%-60%, 多采用Bismuth分型^[4]。本病治疗棘手, 预后很差, 5年存活率<10%, 手术切除率<20%, 80%以上的患者仍须接受包括ERBD在内的姑息性治疗^[5,6]。

在本研究中, 各组肝门部胆管癌患者ERBD术后胰腺炎、出血的发生率无显著性差异($P > 0.05$), 其发生率与其他研究的结果相似^[7]。C组(Bismuth III型和IV型)ERBD术后胆管炎发生率显著高于A组(Bismuth I型)和B组(Bismuth II

型)($P < 0.01$)。此与经EMBE治疗肝门部胆管癌的结果相似^[8]。分析其原因可能是由于支架对Bismuth III型和IV型的各肝段内胆管胆汁引流不畅所致, 另外, 在肝门左右两侧分别置入的支架可能阻塞梗阻邻近部位的肝段内胆管造影剂和胆汁的引流。此假设同样也可解释肝门部胆管癌Bismuth III型和IV型在支架置入后退黄有效率显著低于Bismuth I型和II型($P < 0.01$)。经内镜途径放置胆道支架, 尽管内镜及附件均严格消毒, 但由于内镜经过的通道为胃肠道, 存在污染可能, 不能保证无菌环境, 一旦附件通过污染的操作通道进入梗阻段以上胆管并注入造影剂, 如若不能充分引流, 胆道感染将在所难免。近来, 一种称作“无造影剂(contrast-free)塑料支架置入术”的新方法被运用于治疗包括肝门部胆管癌在内的恶性胆道梗阻, 经内镜插入导丝越过胆道梗阻段后退出造影导管, 替换引导导管(guiding catheter), 再循引导导管置入胆道支架^[9,10]。

在本文中, A组中有1例术后退黄无效, 后经更换支架后黄疸消退。因此, 在ERBD术后如短期内即出现发热、黄疸未缓解甚至加重, 应考虑支架移位或引流不畅, 则需再次行内镜检查, 重新放置支架, 如若治疗无效, 必须行PTCD引流及支架置入, 然而需要注意的是, PTCD虽然可缓解90%患者的胆道梗阻, 但其并发症的发生率却可达26%-38%^[11]。C组中仅有3例(33.33%)胆管炎为放置单侧支架者, 此发生率与在其他研究中放置单侧塑料支架治疗肝门部胆管癌术后胆管炎的发生率相似^[12]。关于肝门部胆管癌是否有必要同时对左、右肝叶进行引流一直存在争论。Chang等^[13]提出, 在肝门部恶性梗阻患者中, 置入双侧支架患者的生存率显著高于造影剂在肝左、右两叶显影但仅置入单侧支架引流一叶的患者。然而, De Palma等^[14]随机将157例肝门部恶性梗阻患者分成两组分别行胆道单、双支架置入术后却发现, 双支架置入组术后胆管炎发生率显著高于单支架置入组。另外, Polydorou等^[15]的研究显示, 在分别引流左肝和右肝的患者中支架引流有效率、并发症、支架更换率, 30 d死亡率以及生存率均无显著性差异。

总之, 通过本研究显示, 与Bismuth I型和II型相比Bismuth III型和IV型肝门部胆管癌在ERBD术后胆管炎发生率更高, 且术后退黄效率更低。但是本文为回顾性研究, 故而无法完全避免一些偏倚和混杂因素, 如, 本文中各组病例数相对较少, 且患者在术前和术后48 h内均接受过

■创新盘点

本研究发现, 应用ERBD治疗肝门部胆管癌, 术后并发症以及退黄效果与肿瘤侵犯范围有关。Bismuth III型和IV型术后更易并发胆管炎, 且退黄效果不佳。

■同行评价

本文立意新颖, 设计合理, 对临床治疗有一定的指导价值。

不同种类的抗生素治疗, 这势必会影响术后胆管炎的发生和发展. 因此, 需要更大样本的、受到良好控制的前瞻性随机对照研究对肝门部胆管癌Bismuth分型与ERBD术后并发症及退黄效果之间的关系进行更加准确地评估。

4 参考文献

- 1 Soehendra N, Reynders-Frederix V. Palliative bile duct drainage - a new endoscopic method of introducing a transpapillary drain. *Endoscopy* 1980; 12: 8-11
- 2 Christoforidis E, Goulmaris I, Kanellos I, Tsalis K, Demetriades C, Betsis D. Post-ERCP pancreatitis and hyperamylasemia: patient-related and operative risk factors. *Endoscopy* 2002; 34: 286-292
- 3 黄晓东, 范彦, 张娟, 刘文敏, 刘小明. 内镜下胆道支架置入术治疗恶性胆道梗阻122例. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3234-3237
- 4 Bismuth H, Castaing D, Traynor O. Resection or palliation: priority of surgery in the treatment of hilar cancer. *World J Surg* 1988; 12: 39-47
- 5 Singhal D, van Gulik TM, Gouma DJ. Palliative management of hilar cholangiocarcinoma. *Surg Oncol* 2005; 14: 59-74
- 6 詹茜, 沈柏用. 肝门胆管癌的治疗进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3313-3317
- 7 Wagner HJ, Knyrim K, Vakil N, Klose KJ. Plastic endoprotheses versus metal stents in the palliative treatment of malignant hilar biliary obstruction. A prospective and randomized trial. *Endoscopy* 1993; 25: 213-218
- 8 Rerknimitr R, Kongkam P, Kullavanijaya P. Outcome of self-expandable metallic stents in low-grade versus advanced hilar obstruction. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 1695-1701
- 9 De Palma GD, Lombardi G, Rega M, Simeoli I, Masone S, Siciliano S, Maione F, Salvatori F, Balzano A, Persico G. Contrast-free endoscopic stent insertion in malignant biliary obstruction. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3973-3976
- 10 Singh V, Singh G, Gupta V, Gupta R, Kapoor R. Contrast-free air cholangiography-assisted unilateral plastic stenting in malignant hilar biliary obstruction. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 88-92
- 11 李红, 吴照宇. 降低PTCD并发症相关措施的探讨. *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 778-780
- 12 Rerknimitr R, Attasanyanya S, Kladchareon N, Mahachai V, Kullavanijaya P. Feasibility and complications of endoscopic biliary drainage in patients with malignant biliary obstruction at King Chulalongkorn Memorial Hospital. *J Med Assoc Thai* 2002; 85 Suppl 1: S48-S53
- 13 Chang WH, Kortan P, Haber GB. Outcome in patients with bifurcation tumors who undergo unilateral versus bilateral hepatic duct drainage. *Gastrointest Endosc* 1998; 47: 354-362
- 14 De Palma GD, Galloro G, Siciliano S, Iovino P, Catanzano C. Unilateral versus bilateral endoscopic hepatic duct drainage in patients with malignant hilar biliary obstruction: results of a prospective, randomized, and controlled study. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 547-553
- 15 Polydorou AA, Chisholm EM, Romanos AA, Dowsett JF, Cotton PB, Hatfield AR, Russell RC. A comparison of right versus left hepatic duct endoprosthesis insertion in malignant hilar biliary obstruction. *Endoscopy* 1989; 21: 266-271

编辑 李薇 电编 李薇

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

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库. 此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊, 并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前, 我国只有两本期刊被PMC收录. 《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊. 《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology*, WJG)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录, 全文免费向公众开放, 见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive> (WJG编辑部主任: 程剑侠 2009-03-26)

内镜超声及其引导下的细针穿刺活检在胰腺疾病中的诊断价值

毛靖伟, 徐鹤鸽, 唐海英, 王英德

毛靖伟, 王英德, 大连医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省大连市 116011

徐鹤鸽, 大连市中心医院消化内科 辽宁省大连市 116033
唐海英, 大连医科大学附属第一医院呼吸科 辽宁省大连市 116011

作者贡献分布: 毛靖伟与徐鹤鸽对此文贡献均等; 此课题由王英德设计; 内镜超声及其引导下的穿刺主要由徐鹤鸽与王英德完成; 资料搜集与数据统计由毛靖伟与唐海英完成; 本论文写作由毛靖伟完成。

通讯作者: 王英德, 教授, 硕士生导师, 116011, 辽宁省大连市中山路222号, 大连医科大学附属第一医院消化内科。

albertwyd@yahoo.com.cn

电话: 0411-83635963-3162

收稿日期: 2010-11-11 修回日期: 2010-12-19

接受日期: 2010-12-29 在线出版日期: 2011-02-18

Diagnostic value of endoscopic ultrasound and endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy in pancreatic diseases

Jing-Wei Mao, Ling-Ge Xu, Hai-Ying Tang, Ying-De Wang

Jing-Wei Mao, Ying-De Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Ling-Ge Xu, Department of Gastroenterology, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116033, Liaoning Province, China

Hai-Ying Tang, Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Correspondence to: Professor Ying-De Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, 222 Zhongshan Road, Dalian 116011, Liaoning Province, China. albertwyd@yahoo.com.cn

Received: 2010-11-11 Revised: 2010-12-19

Accepted: 2010-12-29 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To investigate the diagnostic value of endoscopic ultrasound (EUS) and EUS-guided fine needle aspiration (EUS-FNA) biopsy in pancreatic diseases.

METHODS: The clinical data for 62 patients with pancreatic diseases who underwent EUS (including 32 undergoing EUS-FNA) were retrospective analyzed.

RESULTS: Of 62 patients, 26 had pancreatic cancer, 20 had chronic pancreatitis, 10 had pancreatic cyst, and 2 had islet cell adenoma. The rates of achieving final diagnosis by B ultrasound, CT scan, and EUS/EUS-FNA were 46.2%, 69.2%, and 88.5% in patients with pancreatic cancer, 50%, 66.7%, and 100% in patients with chronic pancreatitis, 50%, 83.3%, and 100% in patients with pancreatic cyst. Pancreatic occupying lesions can be confirmed by EUS-FNA, through which we found 2 cases of islet cell adenoma.

CONCLUSION: EUS is more accurate than B ultrasound and CT scan in the diagnosis of pancreatic diseases. EUS in combination with EUS-FNA can further enhance the diagnostic accuracy of pancreatic diseases.

Key Words: Endoscopic ultrasound; Fine needle aspiration; Pancreatic disease

Mao JW, Xu LG, Tang HY, Wang YD. Diagnostic value of endoscopic ultrasound and endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration biopsy in pancreatic diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 533-537

摘要

目的: 探讨内镜超声(EUS)及其引导下的细针穿刺活检(EUS-FNA)在胰腺疾病诊断中的价值。

方法: 回顾性分析2008-03/2010-03经EUS检查的62例胰腺疾病, 其中有32例行细针穿刺活检。

结果: (1)62例胰腺疾病中胰腺癌26例、慢性胰腺炎20例、胰腺囊肿10例、胰岛细胞瘤2例; (2)B超、CT、EUS/EUS-FNA对胰腺癌的诊断率分别为: 46.2%、69.2%、88.5%; 对慢性胰腺炎的诊断率为: 50%、66.7%、100%; 对胰腺囊肿的诊断率分别为: 50%、83.3%、100%; (3)EUS-FNA可以明确胰腺疾病的性质, 2例胰岛细胞瘤通过EUS-FNA而得以确诊。

结论: EUS对胰腺疾病的诊断正确率较常规的B超、CT高, 联合EUS-FNA更能提高其诊断的准确性。

■背景资料

EUS通过内镜进入腔内, 获取管壁层次的组织学声像特征及周围邻近脏器的超声图像, 并且可以通过EUS引导细针穿刺活检获得病理。EUS对胰腺实质和胰管显示良好, 已成为诊断胰腺疾病的重要手段。

■同行评议者

郝建宇, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化内科

■研究前沿

EUS对胰腺实质和导管均能清晰显示,对胰腺的扫描几乎无盲区,故其在胰腺疾病诊断中的地位越来越重要。对于某些病灶,联合EUS-FNA可以明确病变的性质。EUS在胰腺疾病诊断中的价值及EUS引导下的胰腺囊肿穿刺术已成为当下研究的热点和重点。

关键词: 内镜超声; 细针穿刺活检; 胰腺疾病

毛靖伟, 徐鸽鸽, 唐海英, 王英德. 内镜超声及其引导下的细针穿刺活检在胰腺疾病中的诊断价值. 世界华人消化杂志 2011; 19(5): 533-537

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/533.asp>

0 引言

内镜超声(endoscopic ultrasound, EUS)是将微型高频超声探头安置在内镜顶端,通过内镜进入腔内,观察腔内形态,获取管壁层次的组织学声像特征及周围邻近脏器的超声图像,并且可以通过超声内镜引导下细针穿刺(EUS guided-fine needle aspiration, EUS-FNA)活检而获得病理组织学的诊断。EUS具有内镜和超声的双重功能,他的临床应用提高了消化病的诊治水平。由于EUS对胰腺实质和胰管的良好显示,已经成为诊断胰腺疾病的重要手段。我们通过对62例经EUS检查的胰腺疾病进行回顾性分析,进一步探讨胰腺疾病的EUS声像图特征及其在胰腺疾病诊断中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-03/2010-03我们共完成62例胰腺疾病的EUS检查,其中32例行EUS-FNA。其中男43例,女19例,平均年龄57.9岁。所有病例均经B超或CT的常规检查发现有或可疑胰腺病变。EUS为日本PENTAX公司生产的EG-3630UR和EG-3830UT(穿刺时使用),主机为EPM3500型,超声诊断仪为日本HITACHI公司的EUB-5500,探头频率5-10 MHz。穿刺针为GIP Hancke-Vilmann 19G内镜超声穿刺针。除EUS-FNA证实为胰腺癌及部分行手术治疗有病理明确诊断外,其余患者均随访3-12 mo。

1.2 方法 按常规胃镜检查前准备,行EUS-FNA的患者均除外凝血功能障碍性疾病,术前2 wk禁用非甾体抗炎药物及其他抗凝血药物。检查时采用水囊法及水充盈法。在超声影像提示下选择合适位置行细针穿刺。将抽取物推于玻片,成条的组织置于甲醛中固定,每处病变重复抽取2-3次。对切片和涂片进行病理学检查。采用回顾分析的方法进行研究。

2 结果

2.1 62例胰腺疾病的EUS检查结果 62例中32例行EUS-FNA,共发现胰腺癌、慢性胰腺炎、胰腺囊肿以及胰岛细胞瘤4种病变。30例仅行EUS

检查的病例中有7例EUS表现为胰腺囊肿(其中有3例术后病理证实为胰腺囊肿);11例EUS提示为炎症,但是其中的3例进一步手术证实为胰腺癌;4例B超示胰腺病变,EUS未见胰腺有病变;8例CT及MRI示胰头癌、壶腹周围癌,EUS也表现为癌,术后病理证实。32例行EUS-FNA的病例中:胰腺癌15例;胰腺囊肿3例;慢性炎症12例;胰岛细胞瘤2例。62例中最终有病理证实的胰腺癌、胰腺炎、胰腺囊肿、胰岛细胞瘤分别为26例、12例、6例、2例。

2.2 上述4种性质的胰腺病变EUS的声像学特征

2.2.1 胰腺癌:表现为边界不清晰,可有周围血管受侵犯、胆总管和胰管受压扩张的低回声。呈低回声或中等回声(图1)。

2.2.2 慢性胰腺炎:胰腺实质腹背分界不清、背侧腺体回声不均、实质高回声点或高回声线聚集、主胰管>2 mm,胰管管壁回声增强,胰腺边缘细波纹状或模糊,实质内见异常回声块(图2)。

2.2.3 胰腺囊肿:胰腺内或胰腺周围的圆形或不规则形无回声病变,后方伴有增强效应,壁薄光滑,透生良好,部分可见絮状回声或组织碎屑样沉积。大部分假性囊肿伴有慢性胰腺炎改变(图2,3)。

2.2.4 胰岛细胞瘤:主要表现为胰腺内有低回声,病变边界清楚,回声均匀,与周围正常胰腺组织区别明显(图4)。

2.3 B超、CT、EUS/EUS-FNA在胰腺疾病中的确诊率(表1)

2.3.1 胰腺癌:确诊为胰腺癌的26例中,经B超发现的有12例、CT诊断的有18例,EUS/EUS-FNA确诊的有23例,他们的确诊率分别为46.2%、69.2%、88.5%。

2.3.2 慢性胰腺炎:12例慢性胰腺炎中,经B超、CT、EUS/EUS-FNA确诊的分别为6例、8例、12例,他们的确诊率分别为50%、66.7%、100%。

2.3.3 胰腺囊肿:确诊的6例胰腺囊肿中,经B超、CT、EUS/EUS-FNA确诊的分别为3例、5例、6例,他们的确诊率分别为50%、83.3%、100%。

2.3.4 胰岛细胞瘤:2例胰岛细胞瘤病例B超及CT未发现明确的胰腺病变,均因临床具有Whipple三联征,故而行EUS-FNA,取得病理证实。

3 讨论

EUS的高分辨率使得其对胰腺实质和胰腺导管均能清晰显示,而且对于胰腺的扫描几乎没有

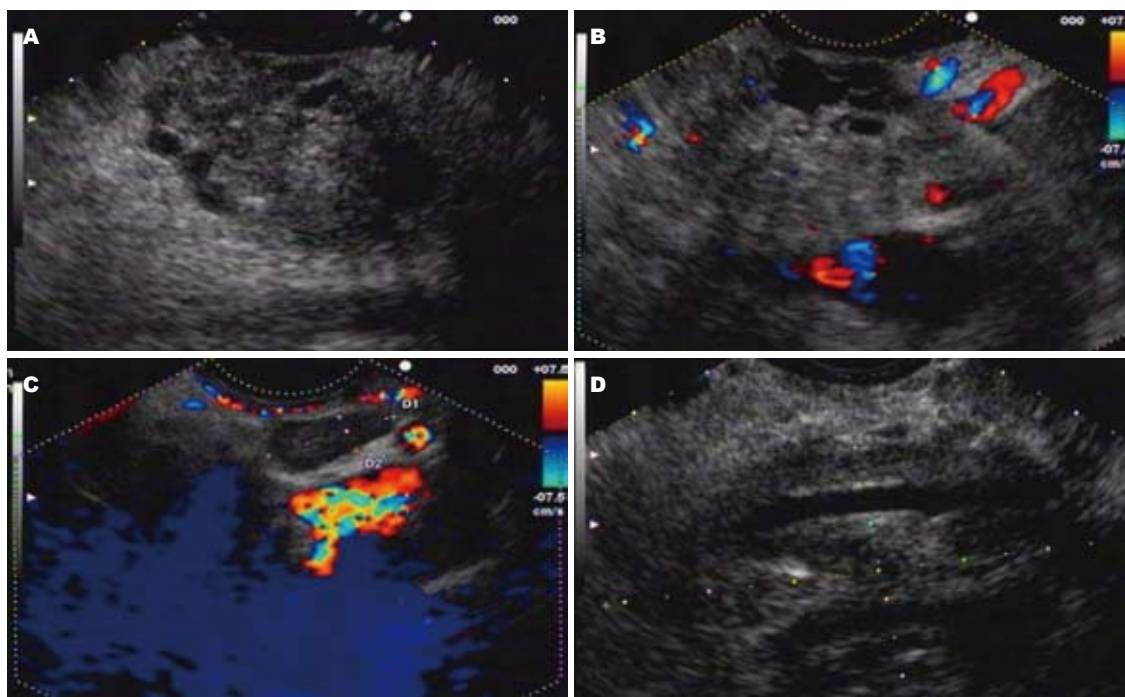


图 1 胰腺癌. A: 胰头癌, 表现为胰头区形态不规则肿物, 边界模糊, 内呈不规则低回声; B: 胰头区肿物, 其内可见少量血流信号; C: 胰腺周围可见肿大淋巴结; D: 胰体部癌, 肠系膜上动脉包绕其中.



图 2 慢性胰腺炎并假性囊肿.

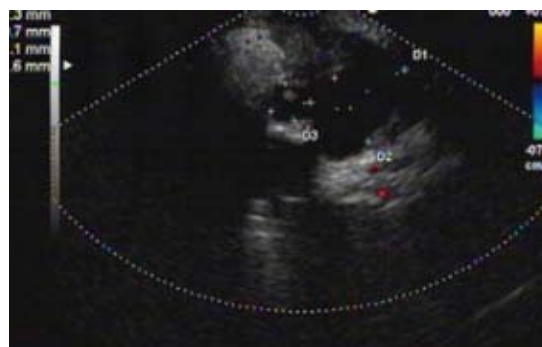


图 3 胰腺囊肿.

盲区, 因而其在胰腺疾病的诊断中具有越来越重要的地位. 在EUS基础上发展的EUS-FNA技术, 使得胰腺疾病的诊断准确率得到了显著提高.

胰腺疾病中的胰腺癌早期诊断较为困难, B超、CT检查往往不能最终确诊, 胰腺癌早期容易漏诊和误诊. EUS明显弥补了常规检查的不足, 可以发现早期胰腺癌, 同时可以判断分期, 针对不同分期指导其手术及其他的治疗方案^[1]. EUS对于胰腺癌的诊断具有较高的敏感性, 特别是<2 cm的病灶. 有学者认为EUS对胰腺癌的诊断敏感性甚至优于PET-CT^[2]. Ngamruengphong等^[3]的研究发现行EUS的胰腺癌患者的中位生存期显著高于未行EUS的病例, 其可能的原因在于EUS可以发现早期的胰腺癌, 同时也可以



图 4 胰岛细胞瘤.

准确地判断胰腺癌不同的分期, 而后可以针对不同的分期进行治疗. 我们的研究表明, B超、CT、EUS/EUS-FNA对于胰腺癌的诊断率分别为46.2%、69.2%、88.5%. EUS较B超及CT对于

■ 相关报道

Galasso等学者的研究表明, EUS能明显弥补常规检查的不足, 可以发现早期胰腺癌, 同时可以判断分期, 针对不同分期指导其手术及其他的治疗方案.

■创新盘点

本文通过分析B超、CT、EUS/EUS-FNA在胰腺癌、慢性胰腺炎、胰腺囊肿以及胰岛细胞瘤4种胰腺疾病中的确诊率,发现EUS/EUS-FNA在胰腺疾病的诊断正确率较B超、CT高。更为重要的是对于常规检查很难发现的微小病灶如岛细胞瘤,EUS-FNA具有无可比拟的优势。

表 1 B超、CT、EUS/EUS-FNA在胰腺疾病中的确诊率 % (n)

检查类型	胰腺癌	慢性胰腺炎	胰腺囊肿	胰岛细胞瘤
B超	46.2(12/26)	50.0(6/12)	50.0(3/6)	0.0(0/2)
CT	69.2(18/26)	66.7(8/12)	83.3(5/6)	0.0(0/2)
EUS/EUS-FNA	88.5(23/26)	100.0(12/12)	100.0(6/6)	100.0(2/2)

胰腺癌的诊断敏感性高。Artifon的研究发现,对与胰腺癌发病类似的壶腹癌的肿瘤分期,EUS较CT更具有特异性和敏感性;EUS联合CT检查并不能提高诊断的准确性,CT不能提高EUS的诊断正确率^[4]。EUS也是依赖于超声图像的声像学特征对疾病进行判断,故而单纯的EUS并不能完全达到100%的诊断率。本研究中即有3例最终确诊为胰腺癌,而EUS却考虑为胰腺炎症。对于病灶性质不明确的病例,可以通过FNA而获得病理学诊断。15例行FNA的胰腺癌病例中,术后切除的病理与FNA完全吻合。EUS-FNA路径短,分辨率高,能准确穿刺直径<1.0 cm的微小病灶,所以联合FNA可以大大提高胰腺癌的诊断准确率。对于CT或MRI发现的疑似胰腺癌的胰腺局灶性病变,EUS-FNA具有较高的诊断准确率,对于这些患者,EUS-FNA可成为确诊的手段^[5]。重要的是,EUS有较高的TNM分期诊断准确率^[6,7]。EUS能显示胰腺癌的大小、肿瘤是否侵犯周围血管、胆总管、十二指肠、肝脏、肾脏和肾上腺的情况以及有无淋巴结转移,能较清楚地显示门静脉和脾静脉。预测胰腺肿瘤可切除性的敏感性达90%。虽然EUS-FNA诊断肿瘤的特异性几乎可以达到100%,但是其敏感性却有较大差异,主要与操作者的技术水平、穿刺的次数、穿刺针等多种因素有关。除了对胰腺癌的诊断外,还可以通过EUS对于胰腺癌进行治疗,主要包括:胰腺癌的腹腔神经节的阻断、肿瘤的射频消融、光动力疗法、近距离的放射治疗,甚至可以局部注射抗肿瘤因子等^[8]。

慢性胰腺炎的诊断,尤其是早期诊断,一直是临床面临的一个难题。现有的B超、CT检查对于慢性胰腺炎诊断的敏感性和特异性均较低。本研究中,B超、CT对于慢性胰腺炎确诊率分别为50%、66.7%。由于EUS具有发现细微的和严重的胰管和胰腺实质的能力,并且与ERCP相比更具有安全性,所以目前对于慢性胰腺的诊断已经是被广泛接受^[9]。由于EUS不仅可以观察胰腺实质,而且可以扫描到胰管以及与胰腺相邻的器官,故而能对慢性胰腺炎做出更为准确

的判断。慢性胰腺炎的EUS声像特征为:胰腺实质腹背分界不清、背侧腺体回声不均、实质高回声点或高回声线聚集、主胰管>2 mm,胰管管壁回声增强,胰腺边缘细波纹状或模糊,实质内见异常回声块。胰腺实质钙化、胰管侧支增多及管壁回声增强是早期慢性胰腺炎的EUS特征。本研究中,EUS/EUS-FNA对于慢性胰腺炎的确诊率达到了100%,说明EUS/EUS-FNA在慢性胰腺炎诊断中具有很高的敏感性及特异性。然而,对于慢性胰腺炎以及其来源的假性囊肿和胰腺癌等占位性病变,仅仅通过EUS,在某些情况下难以确诊,但是联合EUS-FNA则可以显著提高诊断的准确率^[10]。同时,有国外学者发现EUS对于早期轻度慢性胰腺炎的确诊率不到20%,对于中度以上的胰腺炎可达到90%以上^[11]。出现我们的结果这种情况的原因可能与以下因素有关:(1)我们的病例选择上都是经过常规检查发现异常而后行EUS,说明病变程度较重;(2)样本量较少;(3)有一部分行了FNA。

胰腺囊性病约90%为胰腺假性囊肿,常为急性胰腺炎的并发症。胰腺囊肿EUS典型的声像图表现为胰腺内或胰腺周围的圆形或不规则形无回声病变,后方伴有增强效应,壁薄光滑,透声良好,部分可见絮状回声或组织碎屑样沉积。大部分假性囊肿伴有慢性胰腺炎改变。EUS可以清晰显示囊肿的大小、形态、部位,以及与胰腺的关系,并且可以行EUS下的FNA,所以对胰腺的囊性病诊断具有重要意义。我们的研究亦表明,EUS在对胰腺囊肿的诊断方面较B超及CT具有更高的敏感性。更为重要的是,近年来发展起来的EUS引导下胰腺假性囊肿穿刺术是目前比较重要的非手术治疗方法。在EUS引导下选择胃内最佳的穿刺造瘘位置,放置内引流支架,将胰液和炎性液体引出,使得囊肿在短时间内消退,而达到治疗的目的。在某些情况下,可以替代外科手术治疗,而且并发症少^[12]。EUS下的胰腺假性囊肿的穿刺引流是有希望的治疗手段,但是对于那些壁厚、囊肿液黏稠的囊肿以及继发感染的囊肿,仅仅穿刺引流往往难以奏效,还

需要进一步的后续治疗^[13]。

胰岛细胞瘤是常见的胰腺内分泌肿瘤, 临床上Whipple三联征, 但是胰岛细胞瘤的病灶一般较少, 常规检查很难发现, 对于病变的定位更加困难。由于EUS的高分辨率及对胰腺的扫描几乎没有盲区, 所以其能发现常规无阳性发现的胰腺的微小病灶^[14]。正是因为EUS可以发现胰腺的微小病灶, 并且通过FNA可以明确微小病灶的性质, 故近年来胰岛细胞瘤的确诊率得到了明显的提高^[15]。我们发现的2例胰岛细胞瘤, 常规的B超及CT检查均未发现胰腺有明确的病灶, 因为有临床表现而高度怀疑胰岛细胞瘤, 进而行EUS-FNA, 从而确诊。胰岛细胞瘤的EUS图像特征主要表现为胰腺内有低回声, 病变边界清楚, 回声均匀, 与周围正常胰腺组织区别明显。

我们的研究表明, 超声内镜对胰腺疾病的诊断正确率较常规的B超、CT高, 联合内镜引导下的细针穿刺活检可以明确病变的性质, 更能提高其诊断的准确性。

4 参考文献

- 1 Galasso D, Carnuccio A, Larghi A. Pancreatic cancer: diagnosis and endoscopic staging. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14: 375-385
- 2 Mertz HR, Sechopoulos P, Delbeke D, Leach SD. EUS, PET, and CT scanning for evaluation of pancreatic adenocarcinoma. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 367-371
- 3 Ngamruengphong S, Li F, Zhou Y, Chak A, Cooper GS, Das A. EUS and survival in patients with pancreatic cancer: a population-based study. *Gastrointest Endosc* 2010; 72: 78-83, 83.e1-e2
- 4 Artifon EL, Couto D Jr, Sakai P, da Silveira EB. Prospective evaluation of EUS versus CT scan for staging of ampullary cancer. *Gastrointest Endosc* 2009; 70: 290-296
- 5 Krishna NB, LaBundy JL, Saripalli S, Safdar R, Agarwal B. Diagnostic value of EUS-FNA in patients suspected of having pancreatic cancer with a focal lesion on CT scan/MRI but without obstructive jaundice. *Pancreas* 2009; 38: 625-630
- 6 Yamao K, Okubo K, Sawaka A, Hara K, Nakamura T, Suzuki T, Shimizu Y, Ozden I. Endolumenal ultrasonography in the diagnosis of pancreatic diseases. *Abdom Imaging* 2003; 28: 545-555
- 7 DeWitt J, Devereaux B, Chriswell M, McGreevy K, Howard T, Imperiale TF, Ciaccia D, Lane KA, Maglinte D, Kopecky K, LeBlanc J, McHenry L, Madura J, Aisen A, Cramer H, Cummings O, Sherman S. Comparison of endoscopic ultrasonography and multidetector computed tomography for detecting and staging pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 2004; 141: 753-763
- 8 Ashida R, Chang KJ. Interventional EUS for the treatment of pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2009; 16: 592-597
- 9 Stevens T, Parsi MA. Endoscopic ultrasound for the diagnosis of chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2841-2850
- 10 Ardengh JC, Lopes CV, Campos AD, Pereira de Lima LF, Venco F, Módena JL. Endoscopic ultrasound and fine needle aspiration in chronic pancreatitis: differential diagnosis between pseudotumoral masses and pancreatic cancer. *JOP* 2007; 8: 413-421
- 11 Catalano MF, Lahoti S, Geenen JE, Hogan WJ. Prospective evaluation of endoscopic ultrasonography, endoscopic retrograde pancreatography, and secretin test in the diagnosis of chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 1998; 48: 11-17
- 12 Grzebieniak Z, Woytoń M, Kielan W. Surgical and endoscopic treatment of pancreatic pseudocysts. *Przegl Lek* 2000; 57 Suppl 5: 50-52
- 13 Yasuda I, Iwata K, Mukai T, Iwashita T, Moriwaki H. EUS-guided pancreatic pseudocyst drainage. *Dig Endosc* 2009; 21 Suppl 1: S82-S86
- 14 Nesje LB, Varhaug JE, Husebye ES, Odegaard S. Endoscopic ultrasonography for preoperative diagnosis and localization of insulinomas. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 732-737
- 15 Caudill JL, Humphrey SK, Salomão DR. Islet cell tumor of the pancreas: increasing diagnosis after instituting ultrasonography-guided fine needle aspiration. *Acta Cytol* 2008; 52: 45-51

■同行评价

本文选题较好, 对胰腺疾病的诊断具有重要的参考价值。

编辑 李薇 电编 何基才

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

• 消息 •

《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)

闭孔疝15例

张宏, 崔明明, 郑天一, 冯勇, 陈春生

■背景资料

闭孔疝是临床上罕见的一种腹外疝。由于其发病率低, 临床上缺乏特异性, 很难早期确诊。

张宏, 崔明明, 郑天一, 冯勇, 陈春生, 中国医科大学附属盛京医院结直肠肿瘤外科 辽宁省沈阳市 110004

辽宁省高等学校科学技术研究基金资助项目, No. 2009A719
辽宁省科学技术计划基金资助项目, No. 2009225010-22

作者贡献分布: 张宏、崔明明、郑天一、冯勇及陈春生对此文贡献均等; 课题由张宏与陈春生设计; 临床资料由崔明明与郑天一整理; 论文写作由张宏完成; 冯勇及与陈春生负责修改。

通讯作者: 陈春生, 教授, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院结直肠肿瘤外科。

zhanghong1203@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-11-02 修回日期: 2010-12-15

接受日期: 2010-12-15 在线出版日期: 2011-02-18

Diagnosis and management of obturator hernia: an analysis of 15 cases

Hong Zhang, Ming-Ming Cui, Tian-Yi Zheng,
Yong Feng, Chun-Sheng Chen

Hong Zhang, Ming-Ming Cui, Tian-Yi Zheng, Yong Feng, Chun-Sheng Chen, Department of Colorectal Tumor Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: the Scientific and Technological Foundation of Universities of Liaoning Province, No. 2009A719; and the Scientific and Technological Program of Liaoning Province, No. 2009225010-22

Correspondence to: Professor Chun-Sheng Chen, Department of Colorectal Tumor Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. zhanghong1203@yahoo.com.cn

Received: 2010-11-02 Revised: 2010-12-15

Accepted: 2010-12-15 Published online: 2011-02-18

Abstract

AIM: To explore the etiological factors, diagnosis, and management of obturator hernia.

METHODS: The clinical data for 15 patients with obturator hernia who received laparotomy from Aug 2000 to Aug 2010 were analyzed retrospectively.

RESULTS: All patients presented with acute intestinal obstruction. Seven patients underwent an abdominal CT scan, and five of them had obturator hernia. One case was misdiagnosed as perforated gastroduodenal ulcer and nine as mechanical intestinal obstruction. Twelve patients received emergency laparotomy. Three operations were performed 18, 24, and 37 hours

after admission, respectively. Incarcerated small bowel was noted in all patients. Richter hernia was seen in seven cases. Anastomosis was carried out in five cases, and ileostomy in one case after resection of necrotic intestine. Obturator canal defects were repaired with figure-of-eight suture. Three patients suffered from pulmonary infection after operation. One patient suffered from wound infection, and one from multiple organ dysfunction syndrome. All patients were cured, and no recurrence was seen in 12 patients in the follow-up period ranging from 8 months to 7 years.

CONCLUSION: Emaciated elderly multiparous women suffering from sudden intestinal obstruction without definite reasons should be highly suspicious for obturator hernia. The Howship-Romberg sign, Hannington-Kiff sign, and CT scan are helpful to make a correct diagnosis. Early surgical intervention to relieve bowel incarceration is the exclusive therapy for the disease.

Key Words: Obturator hernia; Incarcerated hernia; Intestinal obstruction

Zhang H, Cui MM, Zheng TY, Feng Y, Chen CS. Diagnosis and management of obturator hernia: an analysis of 15 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 538-541

摘要

目的: 初步探讨闭孔疝发病相关因素, 临床特点及诊治方法。

方法: 回顾性分析2000-08/2010-08手术治疗的15例闭孔疝患者的临床资料。

结果: 临床表现均为急性肠梗阻症状。7例行CT扫描, 5例提示闭孔疝嵌顿。1例误诊为胃肠道溃疡穿孔, 另9例诊断为机械性肠梗阻。12例入院后急诊行手术治疗。3例分别保守治疗18、24及37 h后手术。嵌顿疝内容物均为小肠, 7例为肠管壁疝。肠切除吻合术5例, 肠切除、近端回肠造口1例, 其余9例疝内容物还纳后无血运障碍。所有患者行闭孔管口直接8字缝合修补。术后合并肺炎感染3例, 切口感染1例, 多

■同行评议者

杨柏霖, 副主任医师, 南京中医药大学附属医院结直肠外科

脏器功能衰竭1例. 全组15例均治愈. 随访12例, 随访时间8 mo-7年, 无闭孔疝复发.

结论: 对于瘦小的多产高龄女性, 突发病因不清的机械性小肠梗阻时应该考虑闭孔疝的可能. Howship-Romberg征、Hannington-Kiff征及CT检查有助于诊断. 早期手术解除嵌顿, 修补疝环是唯一有效治疗.

关键词: 闭孔疝; 嵌顿疝; 肠梗阻

张宏, 崔明明, 郑天一, 冯勇, 陈春生. 闭孔疝15例. 世界华人消化杂志. 2011; 19(5): 538-541

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/538.asp>

0 引言

闭孔疝是临床上罕见的一种腹外疝, 占有疝的0.05%-0.40%^[1]. 由于其发病率低, 临床上缺乏特异性, 很难早期确诊. 常常是出现绞窄性肠梗阻才考虑手术, 导致预后不良. 因此提高对本病的认识, 做出早期诊断和及时治疗, 具有重要意义. 中国医科大学附属盛京医院2000-08/2010-08收治闭孔疝15例, 现结合相关文献总结分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 中国医科大学附属盛京医院2000-08/2010-08收治闭孔疝15例, 其中男2例, 女13例, 年龄67-88(平均77.2)岁. 体质量33-48(平均40.8) kg. 女性患者分别生育2-8(平均4)胎. 既往子宫切除1例, 脊柱侧弯2例, 高血压病2例, 心肌缺血4例, 慢性支气管炎7例, 慢性阻塞性肺气肿2例, 慢性便秘5例, 2型糖尿病1例. 1例在13 mo前曾有急性肠梗阻发作, 保守治疗好转. 发病至入院时间18-79(平均38) h. 患者均有不同程度的腹痛腹胀、恶心呕吐等急性肠梗阻症状. 11例停止排气排便. 9例腹痛呈持续性阵发性加重. 2例诉疼痛放射至腰部及腹股沟区. 入院体温36.3℃-38.4℃, 腹膜刺激征10例, 肠鸣音有气过水声5例, 肠鸣音减弱4例, 肠鸣音消失6例. 仅5例行直肠及阴道指诊, 无阳性所见. 术前CT怀疑闭孔疝的5例患者追问病史有2例腹痛放射至患侧大腿内侧, 3例患侧大腿内侧有感觉异常. 其余10例在术后追问病史有4例主诉有患侧大腿内侧放射痛.

1.2 方法

1.2.1 辅助检查: 白细胞5.5-17.7(平均12.5)×10⁹/L, 血红蛋白92-141(平均12.3) g/L. 血清白蛋白

28.6-37.3(平均33.3) g/L. 立位腹平片均显示阶梯状排列的多发液气平面, 1例伴有膈下游离气体. 7例行CT扫描, 2例为低位小肠梗阻, 腹腔少量积液, 其余5例CT影像可见腹腔内高度扩张的小肠袢, 在耻骨肌和闭孔外肌之间显示界限清晰的圆形低密度影(图1, 2). 三维CT重建可见小肠突入闭孔管内致管腔闭塞, 近端肠管高度扩张(图3). CT诊断提示闭孔疝嵌顿.

1.2.2 术前诊断: 5例(33.3%)术前诊断为闭孔疝. 1例误诊为消化道溃疡穿孔, 另9例诊断为机械性肠梗阻(原因待查).

1.2.3 治疗: 采12例(4例闭孔疝, 8例肠梗阻)入院后急诊行手术治疗. 2例入院保守治疗18及24 h无效后剖腹探查. 1例诊断明确为闭孔疝的患者, 其家属拒绝手术, 入院后37 h突发剧烈持续性腹痛伴感染性休克, 再次交代病情后行手术治疗. 术中诊断闭孔疝, 左侧8例, 右侧7例. 嵌顿疝内容物均为小肠, 7例为小肠壁疝. 还纳疝内容物后, 9例肠管血运良好, 6例肠管坏死, 其中并发穿孔2例. 行坏死肠管切除、肠吻合术5例, 坏死肠管切除、远端肠管闭合、近端回肠造口1例. 所有病例行闭孔管口直接8字缝合修补. 手术时间89-130(平均103) min.

2 结果

术后合并肺内感染3例, 切口感染1例. 1例肠管坏死穿孔的患者合并多脏器功能衰竭入ICU治疗6 d后转回普通病房. 全组15例均治愈. 回肠造口患者拒绝行二次手术还纳. 随访12例, 随访时间8-24 mo, 无闭孔疝复发, 1例术后2年合并粘连性肠梗阻, 保守治疗好转.

3 讨论

闭孔管是耻骨上支与闭孔膜上缘之间向前内下方斜行的裂隙, 长约2-3 cm. 管壁由坚韧的腱膜及骨质构成, 上界为耻骨上支的闭孔沟, 下界为闭孔内肌、壁层盆筋膜及闭孔膜的游离缘, 闭孔神经及闭孔动静脉走行于其中. 闭孔疝是腹腔内脏器突入闭孔管而形成的一种临床极为罕见的腹外疝. Skandalakis等^[2]将闭孔疝的形成分为三个解剖阶段: (1)腹膜外脂肪及结缔组织突入闭孔管内口; (2)腹膜进入闭孔管内形成疝囊; (3)腹腔内脏器进入疝囊出现临床症状.

闭孔疝以单侧多见, 也有双侧发病的报道^[3]. 由于左侧有乙状结肠的遮挡, 右侧发病多于左侧^[4]. 本组均为单侧发病, 左侧7例, 右侧8例. 女性多见, 文献报道男女比例为1:9^[5], 本组2:13.

■ 相关报道

1983年Cubillo首次报道CT用于诊断闭孔疝. Kammori报道16例闭孔疝通过术前CT检查15例获得确诊.

■创新盘点

本文总结近10年手术治疗的15例闭孔疝患者详细资料,并结合相关文献就闭孔疝的临床表现、诊断和治疗方法做了具体论述。



图1 腹腔内肠管高度扩张,回肠末端在左侧盆壁处瘪陷狭窄。



图2 耻骨肌和左闭孔外肌之间界限清晰的圆形低密度影。

闭孔疝好发于高龄、瘦小、多产的女性,推测与骨盆宽阔及闭孔管周围组织韧带萎缩松弛、覆盖闭孔管的腹膜外脂肪缺如有关^[6,7]。本组患者平均年龄77.2岁,平均体质量40.8 kg,平均生育4胎。疝内容物多为小肠,极少数也可能是卵巢、阑尾、Meckel's憩室、结肠、膀胱等^[8,9]。本组所见均为小肠。

闭孔疝的主要临床表现是肠梗阻和闭孔神经刺激症状。由于闭孔管周围组织为纤维及骨性结构,坚韧无弹性,而且疝环小,疝内容物容易嵌顿。同时由于闭孔疝发病率低,临床表现缺乏特异性,很容易误诊,导致嵌顿肠管坏死,预后不良。临床上对于身材瘦小的老年女性,尤其是伴有多次生育史者,突发原因不明的机械性小肠肠梗阻时应考虑有闭孔疝的可能。下列体征和检查有助于诊断: (1)Howship-Romberg征: 由于闭孔神经受压,腹股沟区和大腿前内侧麻木、刺痛或者感觉过敏,疼痛向膝内侧放射,屈髓外旋或者大腿伸直外展时加重,反之减轻。文献报道50%的患者Howship-Romberg征阳性^[4,8],本组阳性7例(46.7%)。然而由于严重的腹痛往往掩盖了患者的这一症状,而且临床医生在考虑不到闭孔疝的情况下查体也容易忽视这个体征;



图3 CT三维重建显示小肠突入闭孔管内致肠腔闭塞,近端肠管高度扩张。A: 矢状位; B: 冠状位。

(2)Hannington-Kiff征: 由于闭孔神经受压,患侧大腿内收反射消失。由于对本病的认识不足,本组未做此检查。Shipkov等^[10]认为Hannington-Kiff征比Howship-Romberg征更有特异性; (3)由于肠管坏死后疝囊内的血性积液渗出,少数患者在股三角处可见淤血斑。本组患者查体未见这一征象; (4)直肠指诊或阴道内诊: 在截石位2和10点处,部分患者可触及盆壁质软有触痛的包块。但是由于疝块较小,位置深在,在查体时容易忽视^[1]。由于临床医生在小肠梗阻时往往不重视指诊的价值,而且也可能因为经验不足导致重要的发现被遗漏。本组5例行直肠阴道指诊,无阳性所见; (5)CT: 1983年Cubillo首次报道CT用于诊断闭孔疝。Kammori报道16例闭孔疝通过术前CT检查15例获得确诊。目前被认为是最有效、最有价值的检查手段,准确性达到80%以上^[4,11]。本组7例术前CT检查,5例确诊闭孔疝。

闭孔疝需早期手术治疗。手术方式可以是传统开放式手术或者腹腔镜下手术。手术入路有经腹入路,腹股沟入路,耻骨后入路,闭孔入路等^[5,12-14]。我们的体会是闭孔疝很难术前诊断,多为探查性手术,即使术前确诊也不能确定是否有肠管坏死、是否需要肠切除吻合,因此常选择经腹腔入路。其优势在于操作简单,显露清楚,便于手术,探查全面,可避免遗漏病变。术中注意事项: (1)注意探查是否有对侧隐匿的闭孔疝,有无合并腹股沟疝或股疝; (2)全面探查腹腔内有无其他肠梗阻因素; (3)肠管嵌顿难以还纳时不要暴力勉强牵拉以免加重肠管损伤。可用电刀在疝环内下方切开松解,注意不要损伤内上方的闭孔血管和神经; (4)疝内容物还纳后注意判断肠管血运,如果有坏死或者穿孔行肠壁部分切除或肠管部分切除; (5)暴露闭孔管口后8字缝合缝扎疝环; (6)闭孔疝疝环较小,修补时多无张力,一般不需要放置补片。近几年随着微创外

科理念的逐渐推广和相应设备的完善, 技术的成熟, 腹腔镜下闭孔疝手术得到了开展^[12]. 尽管微创是发展方向, 然而其真正推广还受技术经验的限制^[15].

闭孔疝发病率低, 临床上多数仅仅表现为小肠梗阻, 缺乏特异性的症状和体征, 医生对本病也认识不充分, 术前很难做出正确诊断. 同时由于患者多为年老体弱者, 常伴发其他疾病, 手术风险大, 临床医生往往会对手术持犹豫态度, 从而错过手术时机. 待保守治疗病情加重时再考虑手术常常合并肠管坏死, 甚至肠穿孔, 弥漫性腹膜炎, 感染性休克, 导致预后不良. 本组无死亡率, 我们的体会是: (1)对病因诊断不清的肠梗阻, 尤其是对于老年患者, 早期积极手术治疗优于盲目被动的保守治疗; (2)重视全腹CT检查在诊断不清的急腹症中的应用.

总之, 对于瘦小的多产高龄女性, 突发病因不清的机械性小肠梗阻时应该考虑闭孔疝的可能. Howship-Romberg征及Hannington-Kiff征有助于诊断. CT检查常能做出正确诊断. 早期手术解除嵌顿, 修补疝环是唯一有效治疗.

4 参考文献

- 1 Dundamadappa SK, Tsou IY, Goh JS. Clinics in diagnostic imaging (107). *Singapore Med J* 2006; 47: 89-94; quiz 95
- 2 Skandalakis LJ, Androulakis J, Colborn GL, Skandalakis JE. Obturator hernia. Embryology, anatomy, and surgical applications. *Surg Clin North Am* 2000; 80: 71-84
- 3 Chowbey PK, Bandyopadhyay SK, Khullar R, Soni V, Baijal M, Wadhwa A, Sharma A. Endoscopic totally extraperitoneal repair for occult bilateral obturator hernias and multiple groin hernias. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2004; 14: 313-316
- 4 Kammori M, Mafune K, Hirashima T, Kawahara M, Hashimoto M, Ogawa T, Ohta H, Hashimoto H, Kaminishi M. Forty-three cases of obturator hernia. *Am J Surg* 2004; 187: 549-552
- 5 Shapiro K, Patel S, Choy C, Chaudry G, Khalil S, Ferzli G. Totally extraperitoneal repair of obturator hernia. *Surg Endosc* 2004; 18: 954-956
- 6 Chang SS, Shan YS, Lin YJ, Tai YS, Lin PW. A review of obturator hernia and a proposed algorithm for its diagnosis and treatment. *World J Surg* 2005; 29: 450-454; discussion 454
- 7 Pai HW, Chang CM, Wu IC, Chang CM. Obturator hernia: an unusual cause of intestinal obstruction. *J Am Geriatr Soc* 2009; 57: 559-560
- 8 Sorabella RA, Miniati DN, Brandt ML. Laparoscopic obturator hernia repair in an adolescent. *J Pediatr Surg* 2005; 40: e39-e41
- 9 Hakeem AA, Shaheen F, Shafi H, Gojwari TA, Rasool S. CT findings in obturator hernia with Meckel's diverticulum--a case report. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 576-577
- 10 Shipkov CD, Uchikov AP, Grigoriadis E. The obturator hernia: difficult to diagnose, easy to repair. *Hernia* 2004; 8: 155-157
- 11 Haraguchi M, Matsuo S, Kanetaka K, Tokai H, Azuma T, Yamaguchi S, Kanematsu T. Obturator hernia in an ageing society. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36: 413-415
- 12 Yau KK, Siu WT, Chau CH, Yang PC, Li MK. Laparoscopic management of incarcerated obturator hernia. *Can J Surg* 2005; 48: 76-77
- 13 Wu JM, Lin HF, Chen KH, Tseng LM, Huang SH. Laparoscopic preperitoneal mesh repair of incarcerated obturator hernia and contralateral direct inguinal hernia. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2006; 16: 616-619
- 14 Kim JJ, Jung H, Oh SJ, Lee KH, Park SM, Kim YH, Kim JG. Laparoscopic transabdominal preperitoneal hernioplasty of bilateral obturator hernia. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2005; 15: 106-109
- 15 Losanoff JE, Richman BW, Jones JW. Obturator hernia. *J Am Coll Surg* 2002; 194: 657-663

编辑 曹丽鸥 电编 李薇

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

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》 影响因子 0.625

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

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

误诊为十二指肠肿瘤的腹主动脉瘤破裂引起胃肠道出血1例

刘威羽, 刘维新, 蔺虹名

■背景资料

胃肠道大出血病情危重, 及时明确病因可对患者预后产生重大影响。

刘威羽, 刘维新, 蔺虹名, 中国医科大学附属第一医院消化科 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 刘威羽与刘维新对此文所作贡献均等; 此课题由刘维新设计; 论文写作由刘维新与刘威羽共同完成; 研究过程由刘威羽与蔺虹名操作完成。

通讯作者: 刘维新, 副教授, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院消化科. weixinliu@yahoo.com

电话: 024-83282563

收稿日期: 2010-10-21 修回日期: 2010-12-23

接受日期: 2010-12-29 在线出版日期: 2011-02-18

Gastrointestinal hemorrhage caused by abdominal aortic aneurysm rupture misdiagnosed as duodenal tumor: a report of one case

Wei-Yu Liu, Wei-Xin Liu, Hong-Ming Lin

Wei-Yu Liu, Wei-Xin Liu, Hong-Ming Lin, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Correspondence to: Associate Professor Wei-Xin Liu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. weixinliu@yahoo.com

Received: 2010-10-21 Revised: 2010-12-23

Accepted: 2010-12-29 Published online: 2011-02-18

Abstract

Upper gastrointestinal hemorrhage is often life-threatening. Although its clinical diagnosis is easy, it is usually difficult to find out the exact cause. The patient in this case had repeated hematemesis, melena and hemorrhagic shock, which caused great threat to life. Repeated rescues and symptomatic treatments were given. Duodenal tumor was suspected after emergency endoscopy and upper abdominal CT. During the surgery scheduled for the resection of pancreatic-duodenal lesions, arterial spurting occurred. Thus, abdominal aortic aneurysm rupture was diagnosed intraoperatively and then repaired. After inserting an aortic stent, the patient recovered. For patients with gastrointestinal hemorrhage, it is of vital importance to pay attention to uncommon causes of gastrointestinal hemorrhage and to conduct appropriate examinations.

■同行评议者

何松, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科

A clear diagnosis is very important for treatment.

Key Words: Gastrointestinal hemorrhage; Abdominal aortic aneurysms; Misdiagnosis

Liu WY, Liu WX, Lin HM. Gastrointestinal hemorrhage caused by abdominal aortic aneurysm rupture misdiagnosed as duodenal tumor: a report of one case. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(5): 542-543

摘要

上消化道大出血常危及患者生命, 虽然临床诊断容易, 但出血后立即明确病因较困难, 本例患者反复多次出现大量呕血、便血后, 并伴有失血性休克, 对生命造成极大的威胁, 经多次抢救、对症治疗, 急诊胃镜及上腹部CT疑诊十二指肠肿瘤, 后于外科手术中拟行胰十二指肠病灶切除时出现动脉喷射性出血, 术中诊断为腹主动脉瘤破裂入十二指肠, 行腹主动脉破裂修补术, 二期行腹主动脉支架后患者痊愈, 临床上应重视胃肠道出血少见原因, 及时正确选择合适的辅助检查, 明确出血病因, 对治疗、挽救患者生命具有极其重要意义。

关键词: 胃肠道大出血; 腹主动脉瘤; 误诊

刘威羽, 刘维新, 蔺虹名. 误诊为十二指肠肿瘤的腹主动脉瘤破裂引起胃肠道出血1例. *世界华人消化杂志* 2011; 19(5): 542-543

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/542.asp>

0 引言

急上消化道大出血的预后与疾病病因的判断有重大关系, 现将中国医科大学附属第一医院1例误诊病例报道如下。

1 病例报告

59岁, 男, 于入院前1 d呕鲜红色血伴黑便1次, 总量约1 000 mL, 呕血后出现晕厥、出汗。入院时血压107/48 mmHg, 上腹部有轻压痛, 白细胞计数 $11.52 \times 10^9/L$, 血红蛋白71 g/L, 经抑酸、止

血、补液等治疗后生命体征恢复正常, 血红蛋白100 g/L. 行急诊胃镜检查提示十二指肠降段可见一长4-5 cm隆起黏膜, 顶部破溃, 上覆黄绿苔, 触之韧, 病理提示为炎症性改变, 间质瘤不排除, 未见活动性出血; 上腹部CT示十二指肠黏膜增厚, 考虑为十二指肠降段肿瘤可能性大. 3 d后上述症状再次发生, 予扩容、紧急输血、抑酸、止血等治疗后病情稳定, 并行血管造影(digital subtraction angiography, DSA)检查, 结果提示, 腹腔动脉主干、肠系膜上动脉和下动脉, 均未见异常, 无造影剂溢出到十二指肠腔及胃腔. 再次行胃镜检查, 镜下表现同上次胃镜, 十二指肠病变远端开口变为较深溃疡, 上覆有新鲜血痂, 给予1%肾上腺素黏膜下注射并喷洒凝血酶后不再出血, 生命体征平稳. 患者于造影3 d后无明显诱因又出现呕血, 量约800 mL, 并有失血性休克表现. 支持治疗后状态平稳, 行胰十二指肠切除术, 术中发现十二指肠水平段肠壁增厚, 其后壁与腹主动脉粘连, 该处腹主动脉略宽为5.0 cm, 分离十二指肠与腹主动脉的褐色粘连组织, 此处喷射出高压的动脉血柱, 判断为腹主动脉出血, 以手指按压破损处, 裂孔不断加大, 暂行主动脉搏裂处缝合以止血. 在患者病情及生命体征相对稳定阶段, 血管外科医生进行了急诊手术, 术中发现, 腹主动脉瘤体约5 cm×6 cm, 前壁与十二指肠水平段粘连并形成内瘘, 瘘口直径约1 cm. 行腹主动脉假性动脉瘤破裂修补、十二指肠瘘修补、胆囊造瘘、腹腔引流术, 术后患者入外科重症监护病房接受密切观察和治疗, 后经积极治疗患者康复出院.

2 讨论

上消化道出血是消化内科常见病, 其病因复杂多样、易误诊^[1,2], 常见病因有消化道溃疡、食管胃底静脉曲张破裂、急性胃黏膜病变、胃癌、食管贲门黏膜撕裂综合征高^[3,4]等, 急诊胃镜是明确以上出血病因最好的方法^[5]. 有些少见、罕见原因容易引起误诊, 甚至危及患者生命. 为本例患者为中老年男性, 近半年有消瘦症状, 曾两次于出血后半小时内行急诊内镜检查及胃十二指肠动脉造影, 均没找到活动性出血点, CT提示十二指肠水平段增厚, 术前多次会诊都考虑十二指肠恶性病变可能性大, 手术按胰十二指肠切除准备, 术中出现大动脉出血并确诊腹主动脉瘤破裂入十二指肠. 患者既往健康,

无高血压、糖尿病、冠心病、高脂血症、感染及胃病等腹主动脉瘤基础病史, 故未考虑腹主动脉瘤的诊断. 提示临床医生对上胃肠道大出血原因的诊断忽略了少见病, 对腹主动脉瘤认识不足, 再加上原发性腹主动脉瘤术前确诊率很低^[6,7], 不易早期明确诊断, 诸多原因均与本病误诊有关. 术后回顾其病史符合腹主动脉瘤破裂特点: 胃肠道大出血症状起病突然, 出血量大, 并伴有休克, 支持治疗后病情平稳, 输血后血清血红蛋白浓度迅速回升, 每隔3-4 d血压回升后胃肠道出血即复发1次, 对这类不明原因间断反复发作的上胃肠道大出血病例应高度怀疑腹主动脉瘤, 应及时行相关检查, 如急诊内镜、腹腔动脉DSA、腹主动脉增强CT^[8,9]. 腹主动脉瘤破裂致上消化道出血死亡率高, 既往有相关报道^[10,11], 但临床上仍较易误诊, 因此出血原因不明可行剖腹探查以避免误诊, 术前的各种内镜及药物止血均可不同程度降低死亡率^[12], 这样不仅可减少患者的痛苦并且还可节省相当部分的医疗费用, 对临床工作具有积极意义.

3 参考文献

- 1 骆楚钢. 上胃肠道出血235例诊治失误分析. 现代消化及介入诊疗 2008; 13: 59-61
- 2 严艳, 冯晓莹, 张伯伦. 老年性上胃肠道出血的临床分析-附193例. 世界华人消化杂志 2000; 8: 74
- 3 蔡陈效, 冀子中, 陈晓琴. 上胃肠道出血病因趋势及相关因素分析. 胃肠病学和肝病杂志 2008; 17: 387-389
- 4 陈传福, 吴广利, 牟卫平, 许春华, 刘成霞, 牛琼. 胃肠道出血病因学研究. 世界华人消化杂志 2000; 8: 9
- 5 田旭兰. 急诊胃镜诊断上胃肠道出血原因临床分析. 实用医院临床杂志 2010; 7: 147
- 6 宋扬, 沈洪, 刘全达. 国内原发性主动脉胃肠道瘘14例临床分析. 中国急救医学 2005; 25: 299-301
- 7 李雪松, 塞里木, 戈小虎. 原发性主动脉胃肠道瘘的诊断和治疗(1例报道并文献复习). 中国普外基础与临床杂志 2009; 16: 1033-1034
- 8 Yoon W, Jeong YY, Shin SS, Lim HS, Song SG, Jang NG, Kim JK, Kang HK. Acute massive gastrointestinal bleeding: detection and localization with arterial phase multi-detector row helical CT. *Radiology* 2006; 239: 160-167
- 9 麻树人. 上胃肠道出血诊断的思考. 中国实用内科杂志 2007; 27: 982-984
- 10 周晓云. 巨大腹主动脉瘤十二指肠瘘致上胃肠道出血死亡一例. 中华普通外科杂志 2005; 20: 563
- 11 Senadhi V, Brown JC, Arora D, Shaffer R, Shetty D, Mackrell P. A Mysterious Cause of Gastrointestinal Bleeding Disguising Itself as Diverticulosis and Peptic Ulcer Disease: A Review of Diagnostic Modalities for Aortoenteric Fistula. *Case Rep Gastroenterol* 2010; 4: 510-517
- 12 徐昕, 王邦茂. 非静脉曲张性上胃肠道出血的诊断思路与治疗. 中国临床医生 2010; 38: 21-24

■应用要点

患者对症支持治疗后数日再次出现大出血, 提示出血症状与血压变化有关, 可行腹腔动脉DSA明确.

■同行评价

本文学术价值较好, 有助于临床医师对上消化道出血的罕见病因有一个新的认识.

编辑 李薇 电编 李薇