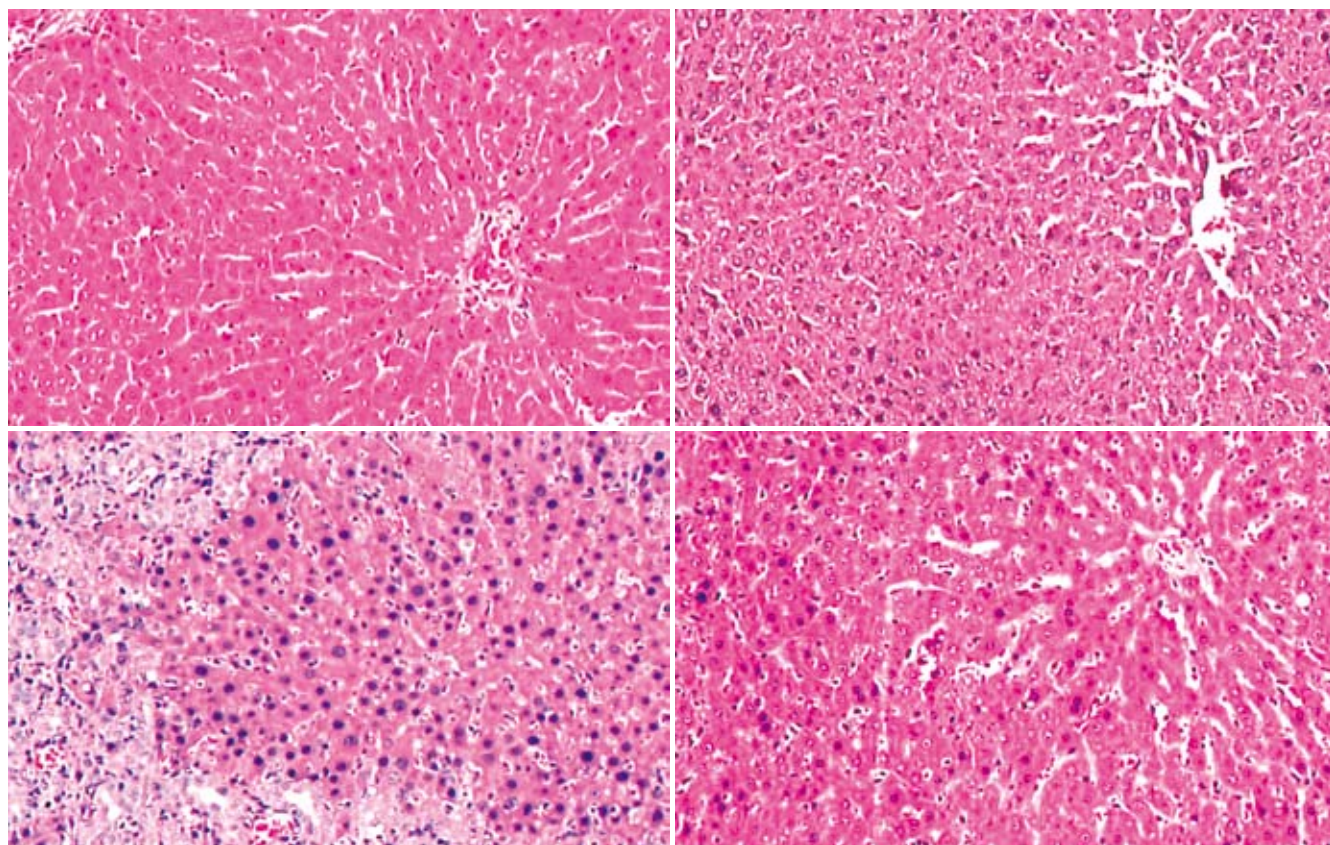


# 世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009 年 3 月 18 日 第 17 卷 第 8 期 (Volume 17 Number 8)



8 / 2009

ISSN 1009-3079



名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

### 总顾问

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

### 名誉总编辑

潘伯荣教授

### 社长/总编辑

马连生教授

### 副总编辑

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

### 常务编委

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

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
聂新明教授  
陈洪副教授

陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌副教授  
迟宝荣教授  
崔立红副教授  
邓长生教授  
丁士刚主任医师  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
樊晓明主任医师  
房静远教授  
冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
高峰副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
郭晓钟教授  
何松教授  
洪天配教授  
胡伏莲教授  
胡和平主任医师  
黄晓东副主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
季国忠副教授  
江米足主任医师  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李定国教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
李玉明教授  
李祖国副教授  
林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海林主任医师  
刘占举教授  
陆伦根教授  
马欣主任医师

倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授  
任粉玉副教授  
任建林教授  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈守荣教授  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
宋于刚教授  
唐世刚教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党副教授  
王晓艳副教授  
闻勤生教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐可树教授  
许乐主任医师  
杨建民教授  
姚树坤教授  
叶红军主任医师  
张春清教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张小晋主任医师  
张晓岚教授  
张筱茵副教授  
张志坚教授  
郑培永副教授  
郑鹏远教授  
周国雄主任医师  
朱春兰主任医师  
邹晓平主任医师

#### 消化外科学

别平教授  
蔡开琳副教授  
蔡三军主任医师  
曹杰主任医师

陈光教授  
陈海龙教授  
陈积圣教授  
陈进宏副主任医师  
陈力教授  
陈立波副教授  
陈凜教授  
陈强谱教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程爱群主任医师  
程树群副教授  
仇毓东副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
单云峰副主任医师  
丁义涛教授  
董明教授  
房林副教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅志仁主任医师  
葛海燕教授  
龚建平教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
何超教授  
何裕隆教授  
黄志勇副教授  
季加孚教授  
英卫东副主任医师  
蒋龙元副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山副主任医师  
李靖副教授  
李奇林教授  
李胜研究员  
李涛副主任医师

李文岗副教授  
李旭副教授  
梁力建教授  
刘超副教授  
刘建教授  
刘作金副教授  
卢实春教授  
陆才德教授  
禄韶英副主任医师  
吕明德教授  
吕云福教授  
彭吉润主任医师  
彭心宇教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民副主任医师  
邱宝安主任医师  
邱双健副教授  
邱伟华副主任医师  
裘正军教授  
沈柏用副教授  
沈世强教授  
施诚仁教授  
石毓君副研究员  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙学英教授  
孙延平副主任医师  
邵升副教授  
汤恢煊教授  
田晓峰教授  
汪波副主任医师  
汪根树副教授  
王春友教授  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王广义教授  
王健生教授  
王鲁副教授  
王蒙副教授  
王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王要军教授  
王悦华副主任医师



# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

王振宁教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
吴河水教授  
吴健雄教授  
吴金术教授  
吴泰璜教授  
吴志勇教授  
谢敏主任医师  
谢晓华副教授  
邢光明教授  
徐大华主任医师  
徐迅迪副主任医师  
徐泱副主任医师  
许戈良教授  
严律南教授  
杨柏霖副主任医师  
杨家和主任医师  
杨秋蒙副主任医师  
杨维良教授  
伊力亚尔·夏合丁教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
于则利教授  
郁宝铭教授  
元云飞教授  
张佳林教授  
张进祥副教授  
张俊副研究员  
张群华教授  
张水军教授  
张宗明教授  
周伟平教授  
邹小明教授

### 消化感染病学

陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈仕珠主任医师  
陈耀凯副教授  
陈志辉副主任医师  
党双锁教授  
丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师

高润平教授  
高泽立副教授  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
何生松教授  
胡国信副主任医师  
林菊生教授  
刘杞教授  
刘正稳教授  
貌盼勇研究员  
宁琴教授  
钱林学主任医师  
秦波教授  
石统东副教授  
孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
唐霓副研究员  
唐晓鹏教授  
王凯教授  
王怡主任医师  
魏来教授  
吴建国教授  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨江华副主任医师  
杨林副研究员  
姚鹏副教授  
张继明教授  
张明辉副主任医师  
张绪清副教授  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵连三教授  
周霞秋教授  
朱传武副主任医师  
庄林主任医师

### 消化中医药学

蔡淦教授  
陈治水主任医师  
杜群副研究员  
黄恒青主任医师  
李军祥教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员

刘孟安教授  
刘平教授  
刘绍能主任医师  
沈洪教授  
唐志鹏研究员  
王富春教授  
王新月教授  
谢鸣教授  
徐列明教授  
许玲副教授  
张声生教授

### 消化肿瘤学

曹秀峰主任医师  
曹志成院士  
陈公琰主任医师  
李璠教授  
刘宝瑞教授  
刘彬彬副研究员  
刘云鹏教授  
沈克平主任医师  
肖文华主任医师  
熊斌教授  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师  
陈克敏教授  
官泳松教授  
韩新巍教授  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师  
倪才方教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐爱民副教授  
徐克教授  
杨业发教授  
杨建勇教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授  
郝俊鸣副主任医师  
潘林娜教授  
孙明军教授  
万军教授

吴硕东教授  
袁友红副教授

### 消化中西医结合学

唐文富副教授  
王学美研究员  
魏睦新教授  
张春虎副教授

### 消化基础研究

曹洁副教授  
曹鹏副研究员  
樊红副教授  
高春芳研究员  
高国全教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
胡旭初副教授  
黄文林教授  
李刚教授  
李杰副教授  
李永哲副研究员  
李增山副教授  
刘克辛教授  
梅林教授  
彭曦副研究员  
钱睿哲教授  
任超世研究员  
任浩副教授  
台桂香教授  
谭学瑞教授  
田颖刚副研究员  
汪思应教授  
吴军研究员  
吴俊华副教授  
徐宁志研究员  
许文燮教授  
姚登福教授  
阴赅宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬副教授  
张青云研究员  
张学教授  
赵平副教授  
周南进研究员  
周士胜教授  
周素芳教授

周晓东研究员  
周晓武副主任医师

### 消化病理学

杜祥教授  
李淳副教授  
刘丽江教授  
刘勇钢副主任医师  
马大烈教授  
潘兴华副主任医师  
王鲁平主任医师  
王娅兰教授  
魏蕾教授  
阎晓初副教授  
颜宏利副教授  
于颖彦教授  
余宏宇教授  
张锦生教授  
赵景民教授  
朱亮副教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2009 年 3 月 18 日 第 17 卷 第 8 期 (总第268期)

## 述 评

- 743 未来肝癌治疗的新靶点-肝癌干细胞  
江春平

## 基础研究

- 747 砷暴露与大鼠肝脏损伤及激活素A, 转化生长因子- $\beta$ 1的相关性  
刘芙蓉, 吴君, 闫超, 张莉莎
- 753 下丘脑STAT3在非酒精性脂肪性肝病大鼠发病中的作用及降脂颗粒的干预  
郑培永, 张莉, 柳涛, 王森, 邢练军, 季光
- 758 吡格列酮对SD大鼠非酒精性脂肪肝病形成的预防作用及其机制  
张佳妮, 陈金虎, 谭莺, 刘慧霞
- 765 红景天甙对肝纤维化大鼠肝组织ROCK表达的影响  
吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 秦建平, 徐辉, 王钊
- 770 细胞外信号调节激酶与胶原在肝纤维化过程中的表达及相关性  
强晖, 徐红娟, 周国雄, 黄介飞, 黄华, 张弘
- 775 靶向Skp2基因siRNA对大肠癌细胞生物学特性的影响  
解方为, 彭永海, 张霞, 欧阳学农
- 780 射频消融治疗对兔肝VX2肿瘤VEGF表达的影响  
倪雪君, 成建萍, 周国雄, 于秀, 丁晓凌, 张海峰

## 临床研究

- 785 Par-3及Connexin在结直肠肿瘤中的表达变化  
刘俊, 刘胜洪, 刘金林, 赵刚, 张维康

## 文献综述

- 790 食管肠神经系统调控的研究进展  
张晓艳, 谢鹏雁
- 798 经皮经肝肝内门体分流术后肝性脑病发病机制及其预防  
刘锋, 张春清
- 805 钙结合蛋白S100A4与消化系肿瘤研究进展  
李宾, 田相国, 秦成勇

## 研究快报

- 809 川芎嗪对HSC-T6增殖的影响  
汪晓军, 马赞, 李秀惠, 张奉学, 刘妮
- 813 选择性iNOS抑制剂对肝硬化大鼠门脉高压性胃黏膜病变的影响  
王凝, 展玉涛, 高福生, 刘宾
- 817 ATP酶在细菌潜生体相关的IBS大鼠模型肠黏膜中的变化  
裴轶劲, 黄梅, 郭林明, 吴小兰, 刘俊康
- 821 氩离子凝固术对兔大肠黏膜的损伤作用  
窦艳, 刘庆森, 杨云生, 孟江云

## 临床经验

- 825 胃镜及内镜超声在食管乳头状瘤诊治中的价值  
黄焕军, 郑要初, 程斌, 杨玉珍, 王南下
- 829 不同类型胃食管反流病发病机制的差异  
张灵云, 蓝宇, 王玘

	834 骨形态发生蛋白2、6在肝癌中的表达及意义 吴建兵, 傅华群, 黄龙璋, 刘安文, 张吉翔
	838 肝内胆管细胞性肝癌临床特点分析90例 吴亚夫, 施晓雷, 徐庆祥, 丁义涛
	841 B7-H1在结肠癌组织中的表达及意义 刘书漫, 刘国红, 张钦宪, 刘占举
	844 低分子肝素治疗消化系肿瘤合并深静脉血栓患者63例 熊慧华, 石磊, 杨林, 胡广原
致 谢	848 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	752 第九次全国消化系疾病学术会议征文通知 764 世界华人消化杂志投稿方式 769 世界华人消化杂志英文摘要要求 774 《World Journal of Gastroenterology》(WJG)成功通过评审被PMC收录 779 第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知 784 《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》 789 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志2007年影响因子0.568 804 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知 812 世界华人消化杂志标点符号用法 816 世界华人消化杂志中文摘要要求 820 全国消化疾病诊治进展学习班在京举办 824 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标 828 WJG荣获2007年“中国百种杰出学术期刊”和2008年中国国际化精品科技期刊 833 世界华人消化杂志外文字符标准
封面故事	刘芙蓉, 吴君, 闫超, 张莉莎. 砷暴露与大鼠肝脏损伤及激活素A, 转化生长因子-β1的相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 747-752 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/747.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/747.asp</a>
本期责任人	编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 何基才; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁, 张晓枚; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生
<div><div><div><div><div></div><div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div><div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</div><div>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-03-18 原刊名 新消化病学杂志</div></div><div><div>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁</div><div>期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</div></div></div><div><div><div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></div><div>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></div><div>印刷 北京科信印刷厂</div><div>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</div><div>订购 全国各地邮电局</div><div>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a></div></div><div><div>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</div><div>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<a href="http://wcjd.wjgnet.com">http://wcjd.wjgnet.com</a>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</div><div><div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</div><div>2009年版版权归世界华人消化杂志所有</div></div></div></div></div></div>	
中国标准连续出版物号 <u>ISSN 1009-3079</u> CN 14-1260/R	
邮发代号 82-262 国外代号 M 4481 国内定价 每期24.00元 全年864.00元	
广告经营许可证 1401004000050	

# World Chinese Journal of Digestology

## March 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 8

<b>EDITORIAL</b>	743 A new target in future treatment of liver cancer - liver cancer stem cells <i>Jiang CP</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	<p>747 Relationship of arsenic-exposure to liver injury, activin A and transforming growth factor-<math>\beta</math>1 in rats <i>Liu FR, Wu J, Yan C, Zhang LS</i></p> <p>753 Effect of Jiangzhi granule on STAT3 expression in hypothalamus of rats with nonalcoholic fatty liver disease <i>Zheng PY, Zhang L, Liu T, Wang M, Xing LJ, Ji G</i></p> <p>758 Preventive effect of pioglitazone against nonalcoholic fatty liver disease in Sprague-Dawley rats and its mechanism <i>Zhang JN, Chen JH, Tan Y, Liu HX</i></p> <p>765 Effects of salidroside on expression of ROCK in rats with liver fibrosis <i>Wu XL, Zeng WZ, Jiang MD, Qin JP, Xu H, Wang Z</i></p> <p>770 Expression of extracellular signal-regulated kinase in hepatic fibrosis and its correlation with collagen type I and III <i>Qiang H, Xu HJ, Zhou GX, Huang JF, Huang H, Zhang H</i></p> <p>775 Influence of Skp2-targeted siRNA on characteristics of human colorectal cancer cell line <i>Xie FW, Peng YH, Zhang X, Ouyang XN</i></p> <p>780 Effect of radio frequency ablation on vascular endothelial growth factor expression in rabbit liver VX2 tumor models <i>Ni XJ, Cheng JP, Zhou GX, Yu X, Ding XL, Zhang HF</i></p>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	785 Changes in expression of Connexin and Par-3 in colorectal cancer <i>Liu J, Liu SH, Liu JL, Zhao G, Zhang WK</i>
<b>REVIEW</b>	<p>790 Research progress of enteric nervous system in esophagus <i>Zhang XY, Xie PY</i></p> <p>798 Pathogenesis of hepatic encephalopathy and its prevention after transjugular intrahepatic portosystemic shunt <i>Liu F, Zhang CQ</i></p> <p>805 Advances in calcium-binding protein S100A4 and digestive neoplasms <i>Li B, Tian XG, Qin CY</i></p>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	<p>809 Influence of <i>ligustrazine</i> on the proliferation of hepatic stellate cell line T6 <i>Wang XJ, Ma Y, Li XH, Zhang FX, Liu N</i></p> <p>813 Effect of iNOS inhibitor on portal hypertensive gastropathy in cirrhotic rats <i>Wang N, Zhan YT, Gao FS, Liu B</i></p> <p>817 Changes of intestinal mucosa ATPase in the bacterial cryptic growth cell-related IBS rat model <i>Pei YJ, Huang M, Guo LM, Wu XL, Liu JK</i></p> <p>821 Mucosal injury caused by argon plasma coagulation in rabbits <i>Dou Y, Liu QS, Yang YS, Meng JY</i></p>

<b>CLINICAL PRACTICE</b>	<p>825 Values of gastroscopy and endoscopic ultrasonography in diagnosis and treatment of esophageal papilloma <i>Huang HJ, Zheng YC, Cheng B, Yang YZ, Wang NX</i></p> <p>829 Etiological differences for different types of gastroesophageal reflux disease <i>Zhang LY, Lan Y, Wang Q</i></p> <p>834 Expression of bone morphogenetic protein 2 and 6 and clinical significance in liver carcinoma <i>Wu JB, Fu HQ, Huang LZ, Liu AW, Zhang JX</i></p> <p>838 Clinical features of intrahepatic cholangiocarcinoma: an analysis of 90 cases <i>Wu YF, Shi XL, Xu QX, Ding YT</i></p> <p>841 Expression of B7-H1 and its significance in colon cancer <i>Liu SM, Liu GH, Zhang QX, Liu ZJ</i></p> <p>844 Treatment with low-molecular-weight heparin for deep venous thrombosis complicated with digestive tract cancer: an analysis of 63 cases <i>Xiong HH, Shi L, Yang L, Hu GY</i></p>
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	<p>848 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
<b>COVER</b>	<p><i>Liu FR, Wu J, Yan C, Zhang LS.</i> Relationship of arsenic-exposure to liver injury, activin A and transforming growth factor-<math>\beta</math>1 in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(8): 747-752 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/747.asp">http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/747.asp</a></p>
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang, Xiao-Mei Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

## Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993  
**Renamed** on January 25, 1998  
**Publication date** March 18, 2009

### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

### RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology  
of Shanxi Province

### SPONSOR

Taiyuan Research and Treatment Center  
for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,  
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

### EDITING

Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
Telephone: +86-351-4078656  
E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)

### PRINTING

Beijing Kexin Printing House

### PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China  
Telephone: +86-351-4078656  
E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

### OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

### HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

### EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

### SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

### SUBSCRIPTION

RMB 24 Yuan for each issue  
RMB 864 Yuan for one year

### CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

### COPYRIGHT

© 2009 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

### SPECIAL STATEMENT

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

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2009 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

# 未来肝癌治疗的新靶点-肝癌干细胞

江春平

江春平, 江苏省肝胆疾病临床医学中心 江苏省南京市 210008

江春平, 教授, 主任医师, 主要从事消化系统恶性肿瘤综合治疗领域的研究。

卫生部重点基金资助项目, No. WKJ2005-2-032

南京市卫生局重点基金资助项目, No. ZKX0410

通讯作者: 江春平, 210008, 江苏省南京市, 江苏省肝胆疾病临床医学中心, chunpingjiang@yahoo.com.cn

电话: 025-83304616-11902

收稿日期: 2009-01-06 修回日期: 2009-02-18

接受日期: 2009-02-19 在线出版日期: 2009-03-18

## A new target in future treatment of liver cancer - liver cancer stem cells

Chun-Ping Jiang

Chun-Ping Jiang, Jiangsu Clinical Medicine Center of Hepatobiliary Diseases, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Supported by: the Major Program from Ministry of Health, No. WKJ2005-2-032; and the Major Program from Health Bureau of Nanjing City, No. ZKX0410

Correspondence to: Chun-Ping Jiang, Jiangsu Clinical Medicine Center of Hepatobiliary Diseases, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. chunpingjiang@yahoo.com.cn

Received: 2009-01-06 Revised: 2009-02-18

Accepted: 2009-02-19 Published online: 2009-03-18

## Abstract

The hypothesis that tumors come of stem cells has been demonstrated in various human cancers. Cancer is not only a genetic disease but also a stem cell disease. It is a key of regeneration, mutations and recurrence of tumors that gene mutations occur in stem cells and then normal stem cells mutate to cancer stem cells. More recently, there is a hypothesis that hepatocellular carcinoma (HCC) arises by maturation arrest of liver stem cells. Analysis of the cells in HCC supports the presence of cells with stem-cell properties (e.g., immortality, transplantability, and resistance to therapy). However, definitive markers for these putative cancer stem cells have not been found yet and no liver cancer stem cells has been isolated.

**Key Words:** Liver stem cells; Liver cancer stem cells; Hepatocellular carcinoma

Jiang CP. A new target in future treatment of liver cancer - liver cancer stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 743-746

## 摘要

肿瘤起源于干细胞的假说正在各种人类肿瘤中得到证实, 肿瘤不单是一种基因病, 而且是一种干细胞病。基因突变作用于干细胞, 干细胞突变成为肿瘤干细胞, 这是肿瘤发生、再生、转移和复发的关键。最新研究表明, 肝细胞型肝癌可能是由肝干细胞未分化或分化不全引起的。对于肝癌细胞的研究我们知道肝细胞型肝癌中的细胞具有干细胞特性, 如永生性、可移植性以及治疗手段的抵抗性。但至今为止, 确切的肝癌干细胞的标志物没有找到, 而且没有分离出肝癌干细胞。

**关键词:** 肝干细胞; 肝癌干细胞; 肝细胞型肝癌

江春平. 未来肝癌治疗的新靶点-肝癌干细胞. *世界华人消化杂志* 2009; 17(8): 743-746

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/743.asp>

## 0 引言

干细胞是具有多能性的细胞, 能够无限制的自我更新并具有分化成不同的成熟组织类型的多能性。在研究肿瘤的发生发展过程中, 人们发现肿瘤细胞与人体内的成体干细胞具有类似之处, 如他们都能自我更新, 具有不定分化的潜能, 其细胞表面标志也相似等。尽管这两种细胞均能够进行增殖, 但不同之处在于: 肿瘤细胞的增殖不受控制, 而干细胞的增殖则受到严格的调控; 肿瘤细胞增殖后异常分化, 而干细胞则可以分化成正常的成熟细胞。科学家们将这些具备增殖能力和多向分化潜能的肿瘤细胞, 称之为肿瘤干细胞(tumor stem cells, TSC), 并产生了肿瘤干细胞学说。

肝细胞癌是最常见的恶性肿瘤之一。近年来, 就肝癌的发生起源问题一直是有争议的, 然而随着干细胞研究的深入, 越来越多的研究结果证实了肿瘤起源于干细胞的观点。正如白血病细胞由正常干细胞发生突变而来, 对实体瘤的研究结果同样显示正常干细胞与肿瘤干细胞存有很强的相似性, 还可能类似的细胞表面标志。目前研究结果提示肝癌干细胞与肝癌的发生有一定的关系。

## ■背景资料

肝细胞癌是最常见的恶性肿瘤之一。近年来, 就肝癌的发生起源问题一直存有争议, 在肝肿瘤干细胞的研究过程中, 越来越多证据表明肝癌组织中确有肿瘤干细胞存在。随着研究的深入及更多表面标志物的发现, 将会实现对肝癌肿瘤干细胞的分离与鉴定, 进一步揭示肝肿瘤发生发展和转移机制, 为研究肝癌的诊断治疗方法提供理论依据。

## ■同行评议者

戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科; 肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室



## ■研发前沿

虽然一些TSC的存在已经得到了实验性证实,但是否所有的肿瘤都起源于TSC还不清楚。如何识别和分离TSC?这是利用TSC来进行癌症治疗的一个关键环节。根据细胞表面标记的特征,科研人员已经识别和分离出几种TSC。但如何对其他TSC进行分子或者形态上的鉴定,仍然是一项非常艰巨的任务。由于TSC与干细胞的相似性,如何避免对TSC具有杀伤作用的治疗手段影响到正常的干细胞就显得十分重要。靶向治疗TSC的设想令人振奋但并不容易,总之,如何发现能选择性地杀伤TSC的治疗手段是一个仍然需要深入研究的课题。

## ■相关报道

Yang *et al*最新研究表明,通过采用CD90作为肝癌干细胞的细胞表面标志,同时从肝癌细胞株和HCC患者肝癌组织中筛选出CD90阳性的细胞,异种移植入SICD小鼠体内,发现其有致瘤性,肿瘤病理提示符合HCC的诊断。同样的,在HCC患者血清样本中也可以检测到CD90阳性的细胞,从而得出了CD90可以作为肝癌干细胞的一个有价值的细胞表面标志,并可以作为基因诊断和治疗的靶标。

## 1 肿瘤干细胞与肿瘤干细胞学说

自Reya *et al*提出“肿瘤干细胞学说”以来,TSC一直是学者们研究的新热点,肿瘤干细胞学说理论先后在白血病、乳腺癌、脑肿瘤和肺癌中已得到证实<sup>[1]</sup>。实体肿瘤干细胞最早的实验依据是Al-Haji *et al*在NOD/SCID小鼠模型上根据乳腺癌细胞表面分子表型的不同,将癌细胞分为致癌性细胞和非致癌性细胞,致癌性细胞能在一系列移植中形成组织学特性与原发肿瘤一致的肿瘤,这群致癌性细胞被命名为乳腺癌干细胞。近年来,对实体瘤干细胞分子生物学特性的研究进展显著:Singh *et al*在脑瘤中分离纯化出肿瘤干细胞,并提示CD133<sup>+</sup>细胞是脑肿瘤干细胞。Seigel *et al*<sup>[2]</sup>研究显示视网膜母细胞瘤干细胞为ABCG2阳性细胞。Hilbe *et al*<sup>[3]</sup>报道在非小细胞肺癌有CD133分子表达的内皮祖细胞。Houghton *et al*报道胃癌中肿瘤干细胞来源于骨髓干细胞。据此,肿瘤干细胞被定义为:存在于肿瘤细胞群体中少数干细胞样癌细胞亚群,其具有肿瘤细胞和干细胞特征,与肿瘤进展和转移的发生密切相关,是肿瘤产生的根源。由此提出了肿瘤干细胞学说,认为肿瘤可能是正常干细胞在长期自我更新过程中,由于多基因突变导致自我更新失调,最终形成的无限增殖的异常组织。肿瘤干细胞与正常干细胞和肿瘤细胞具有相似性,故其细胞表面标志物也具有相似性,但又不完全相同,利用某些干细胞标志物与肿瘤细胞标志物相结合,有望从肿瘤组织中分离出肿瘤干细胞,并利用其生物学特性即成瘤性进行异体移植对其进行鉴定,从而确定肿瘤干细胞特异性的标志物。正因为TSC是肿瘤发生过程中的最原始细胞,如果可以及早地识别并分离出TSC,就有可能依据其分子标志来对患者进行早期诊断。肿瘤干细胞特异性标志物的确定,将有助于进一步确定肿瘤干细胞及确定治疗肿瘤的靶标。

## 2 肝癌干细胞的研究现状

肝细胞型肝癌,居人类常见肿瘤第5位,占人类肝癌的90%。他的发病率随着乙型和丙型病毒性肝炎的增加而逐年升高<sup>[4]</sup>。肝脏肿瘤的切除和肝移植是目前治疗肝细胞型肝癌的主要手段。但是患者的5年生存率主要是依据患者诊断为肝癌时的肿瘤分期。化疗和放疗对大部分肝细胞型肝癌晚期患者的治疗效果不尽如人意。

关于肝癌发病机制的研究历史久远,但是

至今仍然没有找到明确的基因或其分子标志物,于是人们猜想:以往的研究可能太注重于成人肿瘤细胞,而忽略了肿瘤细胞的根源-TSC<sup>[5-8]</sup>。由于没有高度特异性和高敏感性的标志物,肝细胞型肝癌的早期诊断和治疗面临的形势严峻。据报道,用来诊断肝细胞型肝癌的基因或分子的敏感性和特异性最高达60%-70%。如果能鉴定和分离肝癌干细胞(liver cancer stem cells, LCSCs),那么可以推测由肝癌干细胞表达的分子对诊断肝脏恶性肿瘤具有更高的特异性和敏感性。有报道肝细胞型肝癌细胞株中存在功能性的LCSCs<sup>[9-12]</sup>,但是至今还没有关于肿瘤组织中存在功能性LCSCs的报道。

## 3 肝癌干细胞可能的分子标志

目前肿瘤干细胞的鉴定方法尚未成熟,TSC所占的比例很小,目前还不能从形态学上鉴定肿瘤干细胞,而只能用功能学方法对其自我更新能力和分化潜能的两个主要生物学特征进行评价,因此学者们正试图寻找实体瘤干细胞特征性的“标志物”。目前研究认为肝肿瘤干细胞的来源可能为肝干细胞或肝祖细胞,肝干细胞表达某些表面标志可以作为今后肝肿瘤干细胞筛选的参考标志物。目前已筛选出一些高度表达的标志物,如OV6、CK7、CK19。随着肝干细胞研究的不断深入,研究者们陆续发现一些新标志物。王阁 *et al*<sup>[13]</sup>报道发现:原发性肝癌不同病理组织类型均可表达CK7、CK19、AFP、c-kit和Thy-1多种肝干细胞标志,这可能与肝干细胞的多源性和分化程度有关。另有报道显示:通过免疫组化的方法对混合类型的原发性肝癌病例切片进行分析,联合使用多种肝干细胞表面标记包括:hepPar1、AFP、CK7、CK19、OV-6、c-kit、CD34、CD45、chromogranin-A。提示人类的混合性肝癌可能是由肝癌干细胞/肝脏祖细胞分化而来的<sup>[14]</sup>。Yang *et al*<sup>[15]</sup>最新研究表明,通过采用CD90作为肝癌干细胞的细胞表面标记,同时从肝癌细胞株和HCC患者肝癌组织中筛选出CD90阳性的细胞,异种移植入SICD小鼠体内,发现其有致瘤性,肿瘤病理提示符合HCC的诊断。同样的,在HCC患者血清样本中也可以检测到CD90阳性的细胞,从而得出了CD90可以作为肝癌干细胞的一个有价值的细胞表面标记,并可以作为基因诊断和治疗的靶标。

确定肝癌干细胞标志物的关键是要能够把肝癌干细胞与正常细胞或者癌前病变的细胞区

分离出来或者能够从肝细胞性肝癌中分离出来。但是真正的肝癌干细胞还没有从任何肝脏来源中分离出来。肝癌干细胞与其他肝脏来源的细胞没有形态学上的差异。Villanueva *et al*<sup>[16]</sup>综述了最近关于肝细胞型肝癌的基因组学和信传导途径。但是, 他们所列举的大多数与肝细胞型肝癌相关的基因产物(例如转录因子c-Myc)是非特异性的(正常和不正常增殖的肝细胞都可以表达这些蛋白)。所以确定与肝细胞型肝癌有关的基因产物很困难, 更不用说推测中的肝癌干细胞。

尽管如此, Takahashi *et al*<sup>[17]</sup>报道, c-Myc与其他三个转录因子Oct3/4, Sox2和Klf4可以诱导成人皮肤成纤维细胞成为多向潜能的胚胎干细胞。虽然还没有直接的证据证明Oct3/4和Sox2与肝癌干细胞有关, 这些蛋白认为是与干细胞功能有关, 而且与抑制小鼠和人类胚胎的分化有关; c-Myc与Klf4可以修改染色体结构从而更有利于Oct3/4和Sox2功能的发挥<sup>[17]</sup>。与干细胞功能有关的信号蛋白(比如c-kit), 与胚胎发生有关的信号蛋白(比如Bmi1、Wnt和 $\beta$ -catenin<sup>[18-19]</sup>), 与膜转运有关的信号蛋白(比如, ABCG2<sup>[20]</sup>)还有细胞表面分子(比如CD133用来分离卵圆细胞和其他细胞<sup>[12,21]</sup>)都与卵圆细胞表达和肝细胞型肝癌形成有关。所以, 肝癌干细胞的标志物可能包括干细胞的公共表达蛋白类型; 确定肝癌干细胞的标记的巨大挑战可能就是寻找这些隐蔽细胞的特异性标志物。

#### 4 侧群细胞

侧群细胞(side population, SP)的研究为肿瘤干细胞的分离和鉴定提供了可行性。所谓的“侧群细胞”是指正常的干细胞因为细胞膜上有ATP结合盒膜转运蛋白, 这种蛋白可以有效地将Hoechst33342染料从细胞膜内排出到细胞膜外, 而非侧群细胞(non side population, NSP)则没有这种特性。利用这一特性, 通过荧光细胞活化系统(fluorescence activated cell sorter, FACS)将SP细胞和非SP细胞分选开来。肿瘤干细胞与肿瘤细胞在形态上没有差异, 肿瘤干细胞只是一个功能学概念, 体内致瘤性是鉴定肿瘤干细胞的重要依据。通过侧群细胞的研究, 可以在肿瘤细胞株中将SP细胞与非SP细胞分选开来。分选出来的SP细胞则可以用来检测他们是否有肿瘤干细胞特性: 体内高效的致瘤性。这一技术在肝癌细胞<sup>[22]</sup>, 人胶质瘤细胞和乳腺癌细胞运用时, 发现分离出来的SP细胞只要以100个数量就可以

在体内致瘤, 而非SP细胞则不能致瘤。这样就得出了SP细胞可能组成了肿瘤干细胞。

但是, Hoechst33342染料是具有细胞毒性的, SP细胞因为细胞膜上有ATP结合盒膜转运蛋白保护而不受Hoechst33342染料的毒性作用, 但是NSP细胞因为细胞膜上没有保护性蛋白, 所以不能存活<sup>[23]</sup>。那么, SP细胞的致瘤性究竟是肿瘤干细胞的内在致瘤性, 还是由于人为的Hoechst33342染料的毒性作用? 这还是一个有待解决的问题, 所以, 以是否排除Hoechst33342染料来用于肿瘤干细胞的鉴定是不合理的。然而, ABCG2在细胞表面的表达可能可以作为一个肝癌干细胞的表面标志物来研究<sup>[20]</sup>。

#### 5 结论

目前对肿瘤干细胞的分离广泛使用FACS, 白血病、乳腺癌及脑癌等肿瘤干细胞的分选过程都应用此项技术进行。此项技术需要细胞表面标志物进行识别, 但是目前大多数实体瘤干细胞的表面标志物仍不能确定, 由于肿瘤干细胞在肿瘤中含量很少, 所以其分离工作仍然存在着很大困难。此外肿瘤干细胞鉴定工作多采用NOD/SCID小鼠异体瘤移植, 小鼠本身可能残存的免疫功能对肿瘤产生的结果也将造成一定影响。以往对肿瘤的研究工作大多集中在分子水平上研究基因表达调控对肿瘤发生机制的影响方面, 而肿瘤干细胞是从细胞水平上研究肿瘤形成机制与生物学特征。肿瘤干细胞理论对肿瘤发生与发展过程进行了新的诠释, 为今后肿瘤研究提供了新的方向, 对癌症的预防、早期检测、等级评估及预后都有着重要意义, 也为今后肿瘤治疗提供了新的思路。虽然一些TSC的存在已经得到了实验性证实, 但是否所有的肿瘤都起源于TSC还不清楚。如何识别和分离TSC? 这是利用TSC来进行癌症治疗的一个关键环节。根据细胞表面标记的特征, 科研人员已经识别和分离出几种TSC。但如何对其他TSC进行分子或者形态上的鉴定, 仍然是一项非常艰巨的任务。由于TSC与干细胞的相似性, 如何避免对TSC具有杀伤作用的治疗手段影响到正常的干细胞就显得十分重要。靶向治疗TSC的设想令人振奋但并不容易, 总之, 如何发现能选择性地杀伤TSC的治疗手段是一个仍然需要深入研究的课题。在肝肿瘤干细胞的研究过程中, 越来越多证据表明肝癌组织中确有肿瘤干细胞存在。相信随着研究的深入及更多表面标志物的发现,

#### ■应用要点

肿瘤干细胞鉴定工作多采用NOD/SCID小鼠异体瘤移植, 小鼠本身可能残存的免疫功能对肿瘤产生的结果也将造成一定影响。以往对肿瘤的研究工作大多集中在分子水平上研究基因表达调控对肿瘤发生机制的影响方面, 而肿瘤干细胞是从细胞水平上研究肿瘤形成机制与生物学特征。

### ■同行评价

本综述介绍了肝癌干细胞的研究概况,为今后肿瘤研究提供了可借鉴的新方向。

将会实现对肝癌肿瘤干细胞的分离与鉴定,进一步揭示肝肿瘤发生发展和转移机制,为研究肝癌的诊断治疗方法提供理论依据。

### 6 参考文献

- 1 Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005; 121: 823-835
- 2 Seigel GM, Campbell LM, Narayan M, Gonzalez-Fernandez F. Cancer stem cell characteristics in retinoblastoma. *Mol Vis* 2005; 11: 729-737
- 3 Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Günsilius E, Hilbe G, Wöll E, Kähler CM. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57: 965-969
- 4 McMahon BJ. Epidemiology and natural history of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2005; 25 Suppl 1: 3-8
- 5 Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10946-10951
- 6 O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445: 106-110
- 7 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111-115
- 8 Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1030-1037
- 9 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- 10 Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 820-824
- 11 Yin S, Li J, Hu C, Chen X, Yao M, Yan M, Jiang G, Ge C, Xie H, Wan D, Yang S, Zheng S, Gu J. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer* 2007; 120: 1444-1450
- 12 Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 2542-2556
- 13 王阁, 索金友, 邓婧, 杨进, 郑继军, 王红中, 胡庆, 李增鹏, 肖华亮, 王东. 原发性肝癌不同病理组织类型中肝干细胞的起源分析. *第三军医大学学报* 2006; 28: 114-116
- 14 Zhang F, Chen XP, Zhang W, Dong HH, Xiang S, Zhang WG, Zhang BX. Combined hepatocellular cholangiocarcinoma originating from hepatic progenitor cells: immunohistochemical and double-fluorescence immunostaining evidence. *Histopathology* 2008; 52: 224-232
- 15 Yang ZF, Ngai P, Ho DW, Yu WC, Ng MN, Lau CK, Li ML, Tam KH, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* 2008; 47: 919-928
- 16 Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 55-76
- 17 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
- 18 Chiba T, Zheng YW, Kita K, Yokosuka O, Saisho H, Onodera M, Miyoshi H, Nakano M, Zen Y, Nakanuma Y, Nakauchi H, Iwama A, Taniguchi H. Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology* 2007; 133: 937-950
- 19 Apte U, Thompson MD, Cui S, Liu B, Cieply B, Monga SP. Wnt/beta-catenin signaling mediates oval cell response in rodents. *Hepatology* 2008; 47: 288-295
- 20 Zen Y, Fujii T, Yoshikawa S, Takamura H, Tani T, Ohta T, Nakanuma Y. Histological and culture studies with respect to ABCG2 expression support the existence of a cancer cell hierarchy in human hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2007; 170: 1750-1762
- 21 Rountree CB, Barsky L, Ge S, Zhu J, Senadheera S, Crooks GM. A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential. *Stem Cells* 2007; 25: 2419-2429
- 22 Chiba T, Kita K, Zheng YW, Yokosuka O, Saisho H, Iwama A, Nakauchi H, Taniguchi H. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* 2006; 44: 240-251
- 23 Hill RP. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res* 2006; 66: 1891-1895; discussion 1890

编辑 李军亮 电编 何基才

# 砷暴露与大鼠肝脏损伤及激活素A, 转化生长因子- $\beta$ 1的相关性

刘芙蓉, 吴君, 闫超, 张莉莎

刘芙蓉, 吴君, 闫超, 张莉莎, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004

刘芙蓉, 在读硕士, 主要从事感染病学研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30471592

中国肝炎防治基金会“王宝恩肝纤维化研究基金”资助项目, No. 20070013

作者贡献分布: 此课题总设计、分析工具、实验指导由吴君提供; 刘芙蓉参与本子课题设计; 研究过程由刘芙蓉与闫超操作完成; 数据分析由刘芙蓉完成; 张莉莎对操作给予指导性支持; 本论文写作由刘芙蓉完成.

通讯作者: 吴君, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院感染科. wuwuj@21cn.com

电话: 0851-6774146 传真: 0851-6750569

收稿日期: 2009-01-07 修回日期: 2009-02-01

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-18

## Relationship of arsenic-exposure to liver injury, activin A and transforming growth factor- $\beta$ 1 in rats

Fu-Rong Liu, Jun Wu, Chao Yan, Li-Sha Zhang

Fu-Rong Liu, Jun Wu, Chao Yan, Li-Sha Zhang, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical Colleges, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471592; and the China Foundation of Hepatitis Prevention and Cure, Liver Fibrosis Foundation of Wang Baoren, No. 20070013

Correspondence to: Jun Wu, Department of Infectious Disease, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. wuwuj@21cn.com

Received: 2009-01-07 Revised: 2009-02-01

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the relationship of arsenic-exposure to liver injury in rats, and to understand the effects of activin A (ACTA) and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) on liver injury.

**METHODS:** One hundred and ten rats were randomly divided into control group, model group (NaAsO<sub>2</sub> 100 mg/L) and spontaneous recovery group. Ten rats in control group and model group were sacrificed at the end of 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> months. Spontaneous recovery group was given sodium arsenite solution for the first

month. Ten rats in spontaneous recovery group were randomly chosen and given tap water, then were sacrificed one month later and the rest were still given sodium arsenite solution after the first month. Then, another 10 rats of the rest were given tap water and then sacrificed one month later. The last 10 rats were sacrificed at the end of the fourth month. The rats were sacrificed for the liver function and pathologic examination of hepatic tissue. Real-time RT-PCR was used to examine the expression of ACTA and TGF- $\beta$ 1 mRNA in hepatic tissue of rats.

**RESULTS:** Liver injury in this spontaneous recovery at the end of the one-month arsenic-exposure was significantly relieved. Serum ALT and AST were significantly higher in model group than in control group ( $P < 0.05$ ). Serum ALT in spontaneous recovery one month at the end of the one, two, three-month arsenic-exposed group was lower than that of the one, two, three-month arsenic-exposed group ( $49.33 \pm 13.51$  U/L vs  $62.68 \pm 23.57$  U/L,  $62.75 \pm 14.40$  U/L vs  $64.36 \pm 18.24$  U/L,  $65.74 \pm 11.85$  U/L vs  $69.36 \pm 15.7$  U/L, all  $P < 0.05$ ). ACTA mRNA expression was significantly higher in 3, 4-model groups than those of control group ( $64.83 \pm 28.29$  vs  $28.33 \pm 18.70$ ,  $98.67 \pm 26.80$  vs  $28.33 \pm 18.70$ , both  $P < 0.05$ ). Compared with model group, TGF- $\beta$  expressions in one, two, three-month arsenic-exposed groups had statistically significant difference. ( $46.27 \pm 18.39$  vs  $33.64 \pm 20.17$ ,  $67.06 \pm 20.79$  vs  $33.64 \pm 20.17$ ,  $88.33 \pm 23.42$  vs  $33.64 \pm 20.17$ ,  $110.57 \pm 24.23$  vs  $33.64 \pm 20.17$ , all  $P < 0.05$ ). The expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA was lower in this spontaneous recovery one month at the end of the one, two, three-arsenic-exposed groups compared with those in the one, two, three-arsenic-exposed groups ( $35.36 \pm 16.48$  vs  $46.27 \pm 18.39$ ,  $52.04 \pm 21.37$  vs  $67.06 \pm 20.79$ ,  $70.69 \pm 35.27$  vs  $88.33 \pm 23.42$ , all  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Liver tissue injury is aggravated greatly with the extension of arsenic-exposed by this experiment in a time-dependent manner. ACTA and TGF- $\beta$ 1 are correlated to arsenic-

## ■背景资料

砷可引起不同程度的肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌. 目前研究主要集中在甲基化过程、脂质过氧化、影响脂代谢、直接损伤肝细胞等几种途径. 而细胞因子在砷中毒致肝损伤肝纤维化中作用的研究已经成为热点.

## ■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科



## ■研究前沿

尚未完全阐明的慢性砷中毒肝损伤发病机制的研究已成为研究重点。ACTA, TGF- $\beta$ 1在慢性砷暴露肝损伤过程中所发挥作用正在被认识中。

exposed hepatic injury.

**Key Words:** Arsenic; Liver; Activin A; Transforming growth factor- $\beta$ 1

Liu FR, Wu J, Yan C, Zhang LS. Relationship of arsenic-exposure to liver injury, activin A and transforming growth factor- $\beta$ 1 in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 747-752

## 摘要

**目的:** 探讨水砷暴露与大鼠肝脏损伤的关系, 了解激活素A(ACTA), 转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)在肝脏损伤中的作用。

**方法:** 大鼠110只随机分成对照组、模型组(浓度100 mg/L的亚砷酸钠溶液)、自然恢复组。对照组和模型组分别予第1、2、3、4月末各处死10只, 自然恢复组第1月给予砷溶液, 月末随机取出10只改为自来水, 其余仍给予砷溶液。第2月末处死上月分出的10只, 并在此取出10只改为自来水, 1 mo后处死, 依次类推, 第4月末将最后10只停用砷溶液的大鼠处死。股动脉取血进行血清肝功能和肝组织病理学检查以观察其肝脏损伤的动态变化, 取大鼠肝组织采用实时荧光定量PCR法检测ACTA、TGF- $\beta$ 1的基因表达水平。

**结果:** 砷暴露1 mo后脱离自然恢复1 mo可见炎症细胞浸润明显减轻。ALT、AST模型组中增高, 第3、4月造模, ALT升高差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 造模1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo, ALT降低有统计学意义( $49.33 \pm 13.51$  U/L vs  $62.68 \pm 23.57$  U/L,  $62.75 \pm 14.40$  U/L vs  $64.36 \pm 18.24$  U/L,  $65.74 \pm 11.85$  U/L vs  $69.36 \pm 15.7$  U/L, 均 $P < 0.05$ )。ACTA mRNA第3、4月造模与对照组比较有统计学意义( $64.83 \pm 28.29$  vs  $28.33 \pm 18.70$ ,  $98.67 \pm 26.80$  vs  $28.33 \pm 18.70$ , 均 $P < 0.05$ )。TGF- $\beta$ 1 mRNA 1、2、3、4 mo造模与对照组比较均有统计学意义( $46.27 \pm 18.39$  vs  $33.64 \pm 20.17$ ,  $67.06 \pm 20.79$  vs  $33.64 \pm 20.17$ ,  $88.33 \pm 23.42$  vs  $33.64 \pm 20.17$ ,  $110.57 \pm 24.23$  vs  $33.64 \pm 20.17$ , 均 $P < 0.05$ ); 造模1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo, TGF- $\beta$ 1 mRNA降低有统计学意义( $35.36 \pm 16.48$  vs  $46.27 \pm 18.39$ ,  $52.04 \pm 21.37$  vs  $67.06 \pm 20.79$ ,  $70.69 \pm 35.27$  vs  $88.33 \pm 23.42$ , 均 $P < 0.05$ )。

**结论:** 砷暴露所引起的肝脏损伤随暴露时间的延长而加重, 越早脱离暴露其损伤的肝细胞修复越快; 促炎症因子ACTA、TGF- $\beta$ 1与砷暴露肝损伤的发生相关。

**关键词:** 砷; 肝脏; 激活素A; 转化生长因子- $\beta$ 1

刘芙蓉, 吴君, 闫超, 张莉莎. 砷暴露与大鼠肝脏损伤及激活素A, 转化生长因子- $\beta$ 1的相关性. *世界华人消化杂志* 2009; 17(8): 747-752

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/747.asp>

## 0 引言

近年来动物实验和人群流行病学调查均表明砷进入机体后, 主要分布于肝脏<sup>[1]</sup>, 他可引起不同程度的肝损伤, 肝纤维化, 肝硬化及肝癌<sup>[2-5]</sup>。激活素(activin A, ACT)和转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)同属于一类结构相关的多肽类调控蛋白大家族, 研究表明ACTA与TGF- $\beta$ 1在抑制肝细胞生长、诱导其凋亡、肝脏损伤、肝纤维化形成中发挥重要作用<sup>[6-8]</sup>。我们希望通过肝组织病理学、血清学指标来初步探讨水砷暴露大鼠致其肝脏损伤的关系, 并结合炎症因子ACTA、TGF- $\beta$ 1基因表达产物的检测了解其在肝脏损伤中的作用。目前用于病区慢性砷中毒及其脏器损伤的药物治疗大多疗效尚不确切, 重点在于预防干预, 如宣传教育、改变环境、加强个人防护等, 力求最大限度的避免或减少砷暴露。本实验设立了自然恢复组, 观察脱离砷暴露后肝脏损伤的自然恢复情况。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选择健康清洁级SD大鼠110只, 雌雄各半, 体质量180-200 g, 购自贵阳医学院实验动物中心, 在清洁级动物饲养室进行饲养。721型紫外分光光度计(德国Eppendorf公司), 7300型荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems公司), Ultrospec2100型核酸蛋白分析仪(美国Amersham Biosciences公司), 5810R型台式冷冻离心机(德国Eppendorf公司), AEROSSET2000型全自动生化分析仪。亚砷酸钠( $\text{NaAsO}_2$ , 美国Sigma chemical公司), 批号76H0240。ACTA、TGF- $\beta$ 1引物委托上海生工生物工程有限公司合成。TRIzol试剂、内参( $\beta$ -actin)引物、逆转录cDNA第一链合成试剂盒。POWER SYBR GREEN PCR MASTER MIX均由美国国立卫生研究院(NHI)癌症-环境卫生研究所刘杰博士惠赠。

**1.2 方法** 将实验大鼠随机分成3组: 对照组、模型组、自然恢复组, 各组均给予普通饲料。对照组40只给予自来水自由饮用, 模型组40只给予100 mg/L的亚砷酸钠溶液自由饮用。在实验前, 我们用不同浓度亚砷酸钠溶液(100、200、

300、400 mg/L)让大鼠自由饮用, 摸索模型复制的浓度. 根据实验目的和大鼠的耐受情况, 选定100 mg/L作为实验砷溶液浓度. 对照组和模型组分别予第1、2、3、4月末各处死10只. 自然恢复组30只, 给予普通饲料. 第1月给予砷溶液(100 mg/L), 月末随机取出10只改为自来水, 其余仍给予砷溶液. 第2月末处死上月分出的10只, 并再次取出10只改为自来水, 1 mo后处死, 依次类推, 第4月末将最后10只停用砷溶液的大鼠处死. 股动脉放血后脱颈处死大鼠. 检测血清样本中谷丙转氨酶(ALT), 谷草转氨酶(AST)的含量, 并取肝组织100 mg, 迅速加入1 mL的TRIzol试剂中, 立即提取肝组织总RNA. 其余肝组织放入40 g/L中性甲醛溶液中送病理科作苏木素-伊红(HE)染色.

1.2.1 血清生化指标的检测: 血清ALT、AST的含量由贵阳医学院附属医院生化实验室采用2000型全自动生化分析仪(美国Abbott公司)进行检测.

1.2.2 肝组织的病理检测: 肝组织石蜡包埋、切片、HE染色染色由贵阳医学院附属医院病理科采用光学显微镜检查完成.

1.2.3 RT-PCR检测ACTA: 按参考文献设计并在GenBank进行核对, 委托上海生工合成. 上游引物为5'-CAGTCGTGGACGGTGCAGAAGT-3', 下游引物为5'-GCCTGCGGTGAGGATGGTCTT-3'; TGF-β1: 按参考文献设计并在GenBank进行核对, 委托上海生工合成. 上游引物为5'-TCGACATGGAGCTGGTGAAA-3', 下游引物为5'-CTGGCGAGCCTTAGTTTGGA-3'. β-actin: 引物由美国国立卫生研究院(NHI)癌症-环境卫生研究所刘杰博士惠赠. 上游引物为5'-ACCACATGTACCCAGGCAT-3', 下游引物为5'-CCGGACTCATCGTACTCCTG-3'. 采用标准TRIzol-酚-氯仿一步法提取总RNA, 采用紫外分光光度法测定RNA在波长为260 nm和280 nm时的吸光度值( $A_{260}$ 、 $A_{280}$ ), 以 $A_{260}/A_{280}$ 的比值鉴定RNA的纯度. 逆转录, 实时荧光RT-PCR检测取10 μL总RNA, 经MMLV逆转录酶催化合成cDNA第1链, 以此为模板进行实时荧光定量PCR扩增, 得出各样本末的初始拷贝数. 实验过程中严格设立内参β-actin, 以作为逆转录酶和荧光RT-PCR的质控措施. 逆转录反应体系(20 μL): 包括总RNA 10 μL、10聚合酶链反应缓冲液(10×RT Buffer)2 μL、25×dNTP MIX(10 Mm)0.8 μL、10×RT Random Primers 2 μL、Maltiscribe™ Reverse

Transcriptase 1 μL、Nuclease-free H<sub>2</sub>O 4.2 μL. 循环参数设置: 25℃保持10 min, 升温至37℃保持120 min, 升温至85℃, 保持5 s, 4℃保存, 置于-20℃备用. PCR反应体系(20 μL)包括逆转录产物(cDNA)4 μL、SYBR Green 10 μL、上下游引物各0.5 μL, 余量用RNase-free-H<sub>2</sub>O 5 μL补足. PCR扩增条件: 50℃, 2 min; 95℃, 10 min; 95℃, 15 s; 60℃, 1 min, 40个循环.

统计学处理 计量资料用mean±SD表示, 组间比较采用t检验;  $P<0.05$ 为有统计学意义. 计数资料采用Ridit检验, 应用SPSS11.5统计学软件处理数据.

## 2 结果

2.1 一般情况 对造组大鼠状态良好, 毛发光泽; 模型组大鼠毛发粗糙, 皮肤溃烂, 精神萎靡, 动作迟钝, 易激惹, 进食、进水量明显减少.

### 2.2 肝组织病理检查结果

2.2.1 HE染色光镜下观察 对照组大鼠肝细胞以中央静脉为中心, 呈放射状排列, 无肝细胞变性、坏死及炎症细胞浸润, 小叶结构完整(图1A). 砷暴露1、2 mo模型组大鼠肝脏细胞见大片水样变性及脂肪变性, 可见气球样变性, 汇管区及肝小叶内见炎细胞浸润, 部分肝细胞坏死, 肝小叶结构尚完整(图1B). 砷暴露3、4 mo模型组大鼠比1、2 mo模型组肝脏细胞损伤加重, 除了以上改变外肝纤维组织增生, 肝纤维化加重(图1C). 砷暴露1 mo后自然恢复1 mo可见肝细胞轻度水样变性, 未见脂肪变性及气球样变性, 汇管区及肝小叶内可见少量炎细胞浸润, 肝细胞坏死少, 肝小叶结构完整(图1D). 砷暴露2、3 mo后自然恢复1 mo与砷暴露2、3 mo比较病理改变的变化不明显.

2.2.2 肝组织炎症分级: 肝组织炎症分级参照王泰龄 *et al*<sup>[9]</sup>炎症活动度分级标准. 造模1、2、3、4 mo大鼠肝组织与对照组比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ), 随着砷暴露时间的延长, 肝组织损伤程度加重. 仅造模1 mo后自然恢复1 mo与造模1 mo比较差异有统计学意义( $P<0.05$ , 表1).

2.3 对照组和模型组大鼠血清中ALT、AST的含量 造模1、2、3、4 mo大鼠血清ALT、AST的含量比对照组有所增加, 3、4 mo ALT升高差异有统计学意义( $P<0.05$ ). AST升高无统计学意义( $P>0.05$ ). 造模1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo比造模1、2、3 mo ALT、AST均有所减少, 仅

### ■ 相关报道

李达圣 *et al*报道, 砷中毒患者死于癌症的患者中, 肝癌死亡占30.89%; Santra *et al*给低浓度砷水造模15 mo见少许肝纤维化; 李定国 *et al*报道ACTA参与调节胚胎发育, 骨形成, 红细胞分化, 肝实质细胞分化, 神经细胞存活等多种生理过程, 与肝损伤及肝纤维化的形成有着密切关系; 邓家刚 *et al*报道TGF-β1在肝纤维化的作用是激活HSC, 促使细胞外基质产生增加, 抑制胶原酶及基质金属蛋白酶胶原降解减少, 促进肝纤维化的形成及加重.

### ■创新盘点

本研究成功阐明了砷暴露所引起的肝脏损伤随暴露时间的延长而逐渐加重,但越早脱离暴露其损伤的肝细胞修复越快,促炎症因子ACTA、TGF- $\beta$ 1与砷暴露肝损伤的发生相关。

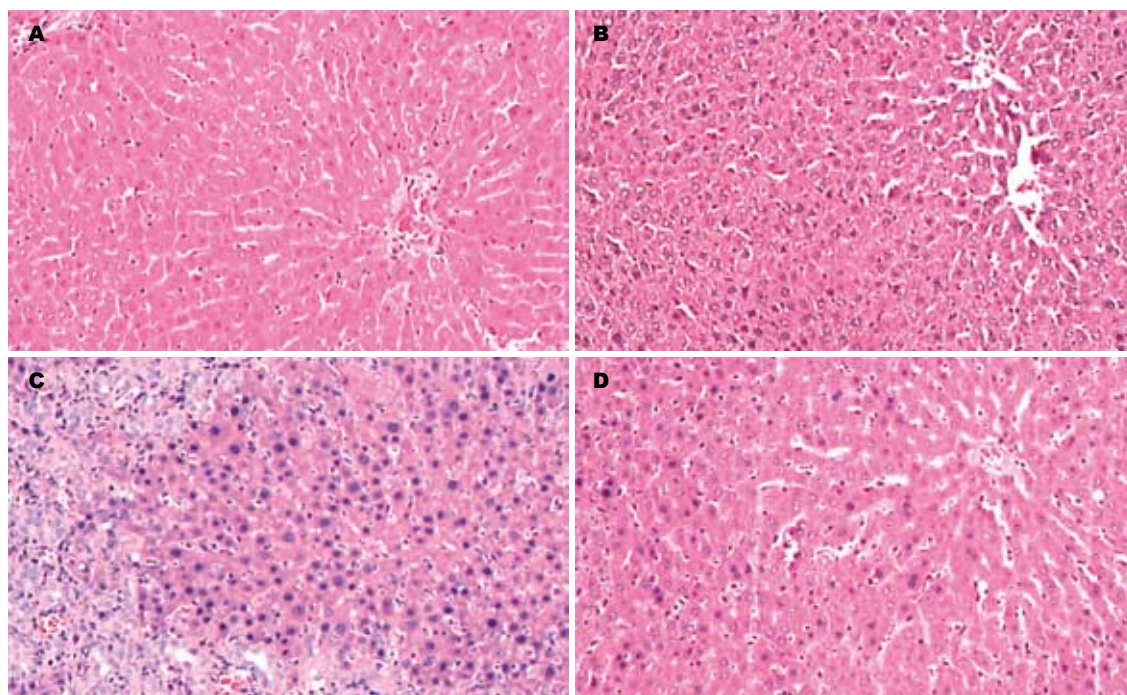


图1 大鼠肝细胞光镜观(H&E, 768 × 576). A: 对照组; B: 2 mo; C: 4 mo; D: 砷暴露1 mo后自然恢复1 mo.

表1 大鼠肝组织炎症活动度 ( $n = 10$ )

分组	肝组织炎症活动度分级					平均R值
	0	I	II	III	IV	
对照组	10	0	0	0	0	0.0938
模型组						
1 mo	2	0	5	3	0	0.4994 <sup>a</sup>
2 mo	0	2	4	4	0	0.5613 <sup>a</sup>
3 mo	0	0	5	5	0	0.6469 <sup>a</sup>
4 mo	0	0	3	6	1	0.7369 <sup>a</sup>
恢复组						
1 mo	2	2	4	2	0	0.4138 <sup>c</sup>
2 mo	0	1	6	3	0	0.5488
3 mo	0	0	7	3	0	0.5731

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 同月模型组.

ALT降低有统计学意义( $P < 0.05$ ), AST差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 表2).

2.4 对造组和模型组大鼠肝组织中ACTA、TGF- $\beta$ 1的mRNA的含量 模型组大鼠肝组织中ACTA、TGF- $\beta$ 1的mRNA表达均高于对照组. 与对照组相比, 造模1、2 mo的ACTA mRNA无统计学意义( $P > 0.05$ ), 第3、4个月有统计学意义( $P < 0.05$ ). TGF- $\beta$ 1 mRNA 1、2、3、4 mo均有统计学意义( $P < 0.05$ ). 造模1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo大鼠肝组织中ACTA、TGF- $\beta$ 1的mRNA表达均低于造模1、2、3 mo. 仅TGF- $\beta$ 1 mRNA降低有统计学意义( $P < 0.05$ ), ACTA mRNA

差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 表3).

### 3 讨论

近年来, 砷中毒致肝损伤肝纤维化的研究已经成为国内外研究热点. 目前的人群流行病学调查报道均表明砷可以引起不同程度的肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌. Santra *et al*<sup>[10]</sup> 248例饮水型砷中毒患者调研发现190例有肝脏肿大(76.6%), 其中69例患者做了肝组织病理检查, 91.3%显示有非硬化性汇管区纤维化的改变. 安冬 *et al* 调查显示砷中毒患者死亡前46%的人感到右上腹疼痛, 38%的人有腹水, 23%的人存在

表 2 对照组、模型组和自然恢复组大鼠血清中ALT、AST的含量 ( $n=10$ , mean  $\pm$  SD)

分组	ALT	AST
对照组	50.68 $\pm$ 4.31	194.50 $\pm$ 27.59
模型组		
1 mo	62.68 $\pm$ 23.57	193.09 $\pm$ 55.79
2 mo	64.36 $\pm$ 18.24	218.53 $\pm$ 33.30
3 mo	69.36 $\pm$ 15.70 <sup>a</sup>	238.53 $\pm$ 86.30
4 mo	104.49 $\pm$ 16.86 <sup>a</sup>	275.01 $\pm$ 74.21
恢复组		
1 mo	49.33 $\pm$ 13.51 <sup>c</sup>	164.81 $\pm$ 58.24
2 mo	62.75 $\pm$ 14.40 <sup>c</sup>	190.38 $\pm$ 35.42
3 mo	65.74 $\pm$ 11.85 <sup>c</sup>	176.68 $\pm$ 30.81

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 同月模型组.

上消化系出血. 李达圣 *et al*<sup>[11]</sup>报道, 砷中毒患者死于癌症的患者中, 肝癌死亡占30.89%. 但是, 砷中毒引起肝损伤肝纤维化的机制尚未完全明确, 目前得研究主要集中在甲基化过程、脂质过氧化、影响脂代谢、直接损伤肝细胞等几种途径<sup>[12-14]</sup>. 而细胞因子在砷中毒致肝损伤肝纤维化中作用的研究已经成为热点<sup>[15-16]</sup>.

实验中我们发现, 砷暴露1、2 mo大鼠可见明显肝组织损伤, 砷暴露3、4 mo肝脏组织损伤继续加重, 并有纤维组织增生. 砷暴露1 mo后自然恢复1 mo仅可见肝细胞轻度损伤, 而砷暴露2、3 mo后自然恢复1个月与砷暴露2、3 mo比较肝组织病理损伤减轻不明显. 砷暴露1、2、3、4 mo大鼠血清ALT、AST的含量比对照组有所增加, 砷暴露1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo比造模1、2、3 mo ALT、AST均有所减少, 这与肝组织病理检查结果一致, 说明砷可以引起明显肝组织损伤, 并且其作用具有蓄积性, 随着砷暴露时间的延长, 肝损伤逐渐加重且有肝纤维化的形成. 而越早脱离砷暴露环境, 肝组织损伤就越容易修复逆转, 但在砷暴露过长后再脱离砷暴露环境, 由于砷已经在体内大量蓄积, 砷及代谢产物等对肝组织的损伤过重, 使修复较慢甚至较难逆转. 这为砷中毒的防治提供了理论依据.

ACTA是一种多功能的细胞因子, 广泛存在于人和大鼠等动物的多个组织和器官中, 参与调节胚胎发育, 骨形成, 红细胞分化, 肝实质细胞分化, 神经细胞存活等多种生理过程, 与肝损伤及肝纤维化的形成有着密切关系<sup>[17]</sup>. TGF-β1是肝纤维化形成过程中一个重要的调控因子, 其在肝纤维化中的主要作用是激活HSC, 促使细

表 3 对照组、模型组和自然恢复组大鼠肝组织中ACTA、TGF-β1的mRNA的含量 ( $n=10$ , mean  $\pm$  SD)

分组	ACTA	TGF-β1
对照组	28.33 $\pm$ 18.70	33.64 $\pm$ 20.17
模型组		
1 mo	42.83 $\pm$ 20.41	46.27 $\pm$ 18.39 <sup>a</sup>
2 mo	56.50 $\pm$ 38.70	67.06 $\pm$ 20.79 <sup>a</sup>
3 mo	64.83 $\pm$ 28.29 <sup>a</sup>	88.33 $\pm$ 23.42 <sup>a</sup>
4 mo	98.67 $\pm$ 26.80 <sup>a</sup>	110.57 $\pm$ 24.23 <sup>a</sup>
恢复组		
1 mo	39.67 $\pm$ 16.40	35.36 $\pm$ 16.48 <sup>b</sup>
2 mo	44.67 $\pm$ 15.80	52.04 $\pm$ 21.37 <sup>b</sup>
3 mo	57.50 $\pm$ 11.55	70.69 $\pm$ 35.27 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组; <sup>b</sup> $P<0.05$  vs 同月模型组.

胞外基质产生增加, 抑制胶原酶及基质金属蛋白酶胶原降解减少, 及间接促星状细胞增殖作用, 促进肝纤维化的形成及加重<sup>[18]</sup>. 研究表明, 随着TGF-β1的分泌增加, TGF-β1促进ACTA合成及ACTA自身正反馈调节作用而使其表达显著增高, 这说明TGF-β1和ACTA都具有致肝细胞损伤, 凋亡, 肝纤维化的作用, 并且二者具有一定的协同效应<sup>[19-20]</sup>. 实验中我们发现, 砷暴露组大鼠肝组织中ACTA、TGF-β1的mRNA表达均高于对照组, 且随着暴露时间的延长, 其表达也逐渐增高, 说明ACTA及TGF-β1在砷暴露致肝损伤、肝纤维化的形成过程中有着重要作用. 砷暴露1、2、3 mo后分别自然恢复1 mo大鼠肝组织中ACTA、TGF-β1的mRNA表达均低于暴露1、2、3 mo组, 提示脱离砷暴露环境后, ACTA及TGF-β1在肝组织损伤的修复过程中起着重要作用, 而停止水砷暴露与肝损伤恢复的相关性有待于进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 吴君. 砷对肝脏毒性的研究进展. 中国药物与临床 2005; 5: 645-647
- 2 杨瑞瑛, 李子洁, 林勤, 王生玲, 张玲, 马品江, 朱殿志, 王连方. 砷中毒大鼠体内各脏器、组织中砷的分布. 中国地方病防治杂志 2005; 20: 260-261
- 3 Xie Y, Trouba KJ, Liu J, Waalkes MP, Germolec DR. Biokinetics and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.AC) mice. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1255-1263
- 4 罗天永, 梁耀东, 吴君. 砷与肝损伤. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2328-2329
- 5 Brown KG, Ross GL. Arsenic, drinking water, and health: a position paper of the American Council on Science and Health. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 36: 162-174
- 6 黄新, 周璐, 李定国, 徐芹芳, 陆汉明. 肝硬化患者血清

#### ■应用要点

本课题组希望通过初步探讨水砷暴露大鼠致其肝脏损伤的关系, 并结合炎症因子ACTA、TGF-β1基因表达产物的检测, 了解其在肝脏损伤中的作用.



## ■同行评价

本研究内容有一定的新颖性,设计合理,方法可靠,结论可信,对了解环境因素对肝脏疾病,特别是肝癌的发生有一定的参考价值。

- 7 激活素A的变化. 胃肠病学和肝病学杂志 2003; 12: 5
- 8 覃后继. 转化生长因子 $\beta$ 在肝纤维化发病和治疗中的意义. 右江民族医学院学报 2008; 30: 473-474
- 9 杨清, 白晶, 柳忠辉. 激活素A与肝纤维化的关系. 山西医科大学学报 2006; 37: 620-622
- 10 王泰龄, 刘霞, 周元平, 何静雯, 张晶, 李宁章, 段钟平, 王宝恩. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案. 中华肝脏病杂志 1998; 6: 195-197
- 11 Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Charkaborty SK, Mazumder DN. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38: 395-405
- 12 李达圣, 安冬, 曾正, 朱爱华, 张锐智. 贵州燃煤型砷中毒患者患恶性肿瘤死亡观察. 中国地方病学杂志 2004; 23: 42-45
- 13 蒋玲, 李玲, 吴君, 欧兵, 张韵, 李诚秀, 程明亮, 杨勤. 氧化应激致慢性砷暴露小鼠肝损伤的作用. 中国公共卫生 2008; 24: 593-595
- 14 熊传龙, 张秀丽, 蔡生花, 王菊, 党洪祥, 潘爱玉, 王虎. 高砷水对机体氧化与抗氧化能力的影响. 中国地方病学杂志 2004; 23: 365-366
- 15 杨瑾, 李金有, 孙天佑, 刘志艳. 亚慢性砷中毒大鼠血脂谱变化特征及机理研究. 中国地方病学杂志 2003; 22: 107-110
- 16 Waalkes MP, Keefer LK, Diwan BA. Induction of proliferative lesions of the uterus, testes, and liver in swiss mice given repeated injections of sodium arsenate: possible estrogenic mode of action. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 166: 24-35
- 17 张韵, 欧兵, 吴君. 砷致肝细胞的炎症反应及凋亡. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2332-2333
- 18 李定国, 陆汉明. 肝硬化患者血清和腹水激活素A的测定. 临床内科杂志 2004; 21: 400-402
- 19 邓家刚, 郑作文, 王勤, 杨柯, 秦华珍, 李学坚, 王春玲. 八个中药复方对2215细胞HBsAg和HBeAg分泌的影响. 广西中医药 2004; 27: 43-47
- 20 杨清, 王永香, 张红军. ACTA、TGF- $\beta$ 1、SOD、MDA与肝纤维化的相关性研究. 中国现代实用医学杂志 2006; 5: 11-12
- 21 黄新, 李定国, 陆汉明, 魏红山, 王志荣, 程计林, 周欣, 徐芹芳. 激活素A、TGF- $\beta$ 1在实验性肝纤维化中的表达比较. 中华肝脏病杂志 2001; 9: 368

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 第九次全国消化系疾病学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会消化病学分会定于2009-12-04/06在广州市召开第九次全国消化系疾病学术会议. 现将会议的征文内容及有关事项通知如下:

## 1 征文内容

与消化系统疾病有关的流行病学、基础及临床研究. (1)功能性胃肠疾病及动力障碍性胃肠病(包括胃食管反流病); (2)幽门螺杆菌及其相关疾病; (3)胰腺疾病; (4)肝胆疾病; (5)胃肠道肿瘤; (6)炎症性肠病; (7)胃肠激素; (8)消化疾病介入治疗; (9)青年委员会专场(全部用英文交流).

## 2 征文要求

(1)报送的论文要求800字左右的中文摘要一份, 摘要内容包括: 目的、方法、结果、结论, 注明作者姓名、单位及邮编, 论文文责自负. 投青年会专场的论文必须附相应的英文摘要, 第一作者年龄须在45周岁以下(1964-11后出生). (2)凡已在全国性学术会议或全国公开发行的刊物上发表过的论文不予受理. (3)通过本次会议专用网站报送电子文稿及报名注册, 会议不接受书面投稿. 要求作者本人通过会议网站上传稿件并留下联系方式, 会议网址: <http://www.csge.org.cn>. (4)截稿日期: 2009-09-15.

希望各地委员积极、认真组织所在地区医生踊跃投稿并参会.

# 下丘脑STAT3在非酒精性脂肪性肝病大鼠发病中的作用及降脂颗粒的干预

郑培永, 张莉, 柳涛, 王淼, 邢练军, 季光

郑培永, 张莉, 柳涛, 王淼, 邢练军, 季光, 上海中医药大学脾胃病研究所 上海中医药大学附属龙华医院消化内科 上海市 200032  
郑培永, 医学博士, 副研究员, 主要从事肝病防治和临床评价研究。国家自然科学基金资助项目, No. 30772802, No. 30872360  
上海市教委重点学科基金资助项目, No. J50305  
作者贡献分布: 郑培永与季光对此文所作贡献均等; 此课题由郑培永与季光设计; 研究过程由张莉、柳涛及王淼操作完成; 数据分析由柳涛与邢练军完成; 论文写作由郑培永与张莉完成。  
通讯作者: 季光, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学脾胃病研究所, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科。  
jiliver@vip.sina.com  
收稿日期: 2008-12-25 修回日期: 2009-02-15  
接受日期: 2009-02-23 在线出版日期: 2009-03-18

## Effect of Jiangzhi granule on STAT3 expression in hypothalamus of rats with nonalcoholic fatty liver disease

Pei-Yong Zheng, Li Zhang, Tao Liu, Miao Wang, Lian-Jun Xing, Guang Ji

Pei-Yong Zheng, Li Zhang, Tao Liu, Miao Wang, Lian-Jun Xing, Guang Ji, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772802, No. 30872360; and the Shanghai Leading Academic Discipline Project, No. J50305

Correspondence to: Guang Ji, Department of Gastroenterology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. jiliver@vip.sina.com

Received: 2008-12-25 Revised: 2009-02-15

Accepted: 2009-02-23 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To observe the expression and activation of hypothalamus STAT3 on rats with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), and to study therapeutically effect of Jiangzhi granule on it.

**METHODS:** High fat-induced NAFLD rats were randomly divided into 3 groups: model group ( $n = 10$ ); Jiangzhi granule group ( $n = 10$ ); simvastatin group ( $n = 10$ ). Blank group were fed with chow food ( $n = 8$ ). Four weeks later, all rats were sacrificed. Liver tissue samples were then collected for pathologic analysis. Liver index, serum TG and TC were detected using colorim-

etry. Phosphorylated STAT3 protein expression of hypothalamus was determined by Western blot while the activated STAT3 expression by EMSA.

**RESULTS:** Phosphorylated STAT3 protein and activated STAT3 expression in hypothalamus were significantly lower in rats with NAFLD. Jiangzhi granule and simvastatin significantly lowered serum levels of TG ( $0.54 \pm 0.09$  mmol/L,  $0.68 \pm 0.08$  mmol/L vs  $0.84 \pm 0.09$  mmol/L, both  $P < 0.05$ ), TC ( $1.85 \pm 0.31$  mmol/L,  $2.08 \pm 0.30$  mmol/L vs  $2.84 \pm 0.30$  mmol/L, both  $P < 0.05$ ), improved steatosis ( $2.26 \pm 0.52$ ,  $2.57 \pm 0.67$  vs  $3.10 \pm 0.57$ , both  $P < 0.05$ ) and relieved inflammation ( $0.68 \pm 0.67$ ,  $0.95 \pm 0.6$  vs  $1.52 \pm 0.71$ , both  $P < 0.05$ ), and up-regulated the phosphorylated and activated STAT3 expression.

**CONCLUSION:** Hypothalamus STAT3 is involved in the mechanism of NAFLD, Jiangzhi granule can effectively improve liver function and steatosis, and up-regulate the expression of STAT3 in hypothalamus.

**Key Words:** Jiangzhi granule; Simvastatin; Nonalcoholic fatty liver disease; Signaling transducer and activator of transcription 3

Zheng PY, Zhang L, Liu T, Wang M, Xing LJ, Ji G. Effect of Jiangzhi granule on STAT3 expression in hypothalamus of rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 753-757

## 摘要

**目的:** 观察非酒精性脂肪肝大鼠下丘脑STAT3蛋白表达和组成性激活的改变, 以及中药降脂颗粒对其干预作用。

**方法:** 高脂饲料制备非酒精性脂肪肝大鼠模型, 待造模成功后将大鼠随机分为模型对照组( $n = 10$ )、辛伐他汀组( $n = 10$ )、降脂颗粒组( $n = 10$ ), 每日进行ig药物干预, 4 wk, 并设空白对照组( $n = 8$ )。比色法检测血清TG、TC; HE染色观察观察肝组织脂肪变和炎症; Western blot检测下丘脑磷酸化STAT3蛋白表达, EMSA检

## ■背景资料

NAFLD是一种代谢性疾病, 发病率有逐年增高的趋势。其病因复杂, 发病机制不明确, 多种调节因子可以作用于其病变过程, 机体脂肪代谢的关键调节激素瘦素, 通过其位于下丘脑的受体而激活STAT3发挥效应从而参与NAFLD的病变过程。

## ■同行评议者

范建高, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

## ■研发前沿

瘦素是近年来的研究热点,其在多种疾病,尤其是代谢性疾病中发挥重要的作用。瘦素的信号通路上相关分子蛋白是众多研究的靶点,并逐渐形成了瘦素抵抗的学说。瘦素成为NAFLD研究探索的新思路,但其具体机制还亟待解决。

测下丘脑STAT3的组成性激活状态。

**结果:**磷酸化STAT3蛋白表达及其组成性激活在非酒精性脂肪肝大鼠均明显降低,降脂颗粒用药组及辛伐他汀组能下调大鼠血清TG( $0.54 \pm 0.09$  mmol/L,  $0.68 \pm 0.08$  mmol/L vs  $0.84 \pm 0.09$  mmol/L, 均 $P < 0.05$ )、TC( $1.85 \pm 0.31$  mmol/L,  $2.08 \pm 0.30$  mmol/L vs  $2.84 \pm 0.30$  mmol/L, 均 $P < 0.05$ )水平,减轻肝脂肪变( $2.26 \pm 0.52$ ,  $2.57 \pm 0.67$  vs  $3.10 \pm 0.57$ , 均 $P < 0.05$ )和炎症程度( $0.68 \pm 0.67$ ,  $0.95 \pm 0.6$  vs  $1.52 \pm 0.71$ , 均 $P < 0.05$ );上调下丘脑组织磷酸化STAT3蛋白表达及其组成性激活。

**结论:**STAT3在非酒精性脂肪肝大鼠下丘脑组织表达和激活明显下降,中药降脂颗粒对非酒精性脂肪肝有很好的治疗作用,并可上调STAT3的表达和组成性激活。

**关键词:**降脂颗粒;辛伐他汀;非酒精性脂肪肝;信号转导及转录激活子3

郑培永,张莉,柳涛,王淼,邢练军,季光.下丘脑STAT3在非酒精性脂肪性肝病大鼠发病中的作用及降脂颗粒的干预.世界华人消化杂志 2009; 17(8): 753-757

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/753.asp>

## 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种无过量饮酒史,以肝细胞脂肪变性和脂质贮积为特征的临床病理综合征,其发病率有逐年升高的趋势。其病理变化随病程的进展而表现有单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝纤维化和肝硬化。NAFLD病变机制复杂,多种调节因子可以作用于其病变过程,但其具体发病机制尚处于探索阶段。瘦素是机体脂肪代谢的关键调节激素,研究发现瘦素主要是通过其位于下丘脑的受体进而激活信号转导及转录激活子(signaling transducer and activator of transcription, STAT3)发挥效应<sup>[1]</sup>。NAFLD属代谢性疾病,中药降脂颗粒长期应用于临床治疗NAFLD,安全而有效。我们通过高脂饮食诱导NAFLD大鼠模型,观察下丘脑STAT3在NAFLD大鼠的变化规律和降脂颗粒对其干预作用,探讨NAFLD的发病机制以及中药降脂颗粒作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 胆固醇,购于国药集团化学试剂有限公司;三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)试剂盒购

于南京建成工程研究所;p-STAT3抗体, Santa Cruz Biotechnology;非放射性STAT3-EMSA Kit: Viagene公司;胞质-核蛋白抽提试剂盒: Viagene公司Cat: SINP001; BCA蛋白浓度测定试剂盒: 碧云天生物公司Cat: P0012;电泳仪Bio-rad power/PAC 200;紫外交联仪(Stratgen公司)。降脂颗粒,上海龙华医院制剂室提供;辛伐他汀,广州南新制药有限公司,批号: SST02207。♂ SD大鼠42只, SPF级,体质量 $180 \pm 10$  g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司(动物生产许可证号: SYXK(沪)2005-0002),饲养于上海龙华医院动物房,适应性饲养1 wk后进入实验。

## 1.2 方法

**1.2.1 造模及分组给药:**参照文献[2]给大鼠饲喂高脂饲料(88%基础饲料+10%猪油+2%胆固醇)造模,第2、4、6、8周各处死造模组1只大鼠观察造模情况。模型成功后将动物随机分为3组:辛伐他汀组( $n = 10$ ):辛伐他汀分散片溶于双蒸水,浓度 $0.8$  g/L,再ig  $5$  mL/(kg·d),降脂颗粒组( $n = 10$ ):降脂颗粒以 $19$  g/L的浓度溶于双蒸水,ig  $5$  mL/(kg·d),相当于ig原生药材 $0.475$  g/(kg·d)和模型对照组( $n = 10$ ):生理盐水ig  $5$  mL/(kg·d)。空白对照组(普通饲料饲喂):ig生理盐水 $5$  mL/(kg·d),观察大鼠的一般情况。持续用药4 wk后戊巴比妥钠麻醉下腹主动脉取血,  $3000$  r/min,  $15$  min离心分离血清,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存以备检测TG, TC指标;将肝脏取下后迅速称质量,随后取肝脏右叶最厚部一份 $40$  g/L的甲醛溶液固定,脱水、透明、石蜡包埋做HE病理染色。光镜下观察肝脂肪变性和炎症程度。肝细胞脂肪变性程度判断标准参照Diehl法<sup>[3]</sup>,炎症活动度计分标准参考1981年Knodell提出的慢性肝炎组织学活动指数(HAI)<sup>[4]</sup>,并结合王泰龄 *et al*<sup>[5]</sup>提出的慢性肝炎炎症活动度计分方案。血清TG、TC严格按照试剂盒说明书操作。

**1.2.2 下丘脑磷酸化STAT3(p-STAT3)蛋白表达测定:**  $100$  mg下丘脑组织剪碎,置于 $1$  mL冰Western细胞裂解液中充分匀浆。将组织匀浆在 $4^{\circ}\text{C}$ 下以 $12\ 000$  r/min离心 $20$  min,采用紫外分光光度计进行蛋白质定量。取总蛋白 $50$   $\mu\text{g}$ ,加等量SDS凝胶加样缓冲液,  $100^{\circ}\text{C}$ 变性 $3$  min,  $100$  g/L十二烷基硫酸钠一聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳后,采用半干式电转移仪(Bio-Rad公司),参照厂家提供程序进行转膜。转移结束后,室温下用含 $50$  g/L脱脂奶粉的PBS封闭 $2$  h,然后分别加入鼠抗人P-STAT3 mAb(购自Santa Cruz公司,工作浓度

## ■相关报道

应用降脂颗粒治疗脂肪肝既有临床报道也有基础研究,有关瘦素的研究多集中在肥胖病症,在瘦素与NAFLD发病的研究中,有学者检测到降脂颗粒可以上调肝组织中磷酸化STAT3蛋白表达,从而发挥其治疗效应。

表 1 降脂颗粒对非酒精性脂肪肝大鼠肝指数、脂肪变及病理炎症的影响 (mean ± SD)

分组	n	脂肪变	病理炎症	肝指数
空白组	8	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	2.54 ± 0.23 <sup>a</sup>
模型组	10	3.10 ± 0.57	1.52 ± 0.71	4.20 ± 0.20
辛伐他汀组	10	2.57 ± 0.67 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.60 <sup>a</sup>	3.88 ± 0.39 <sup>a</sup>
降脂颗粒组	10	2.26 ± 0.52 <sup>ac</sup>	0.68 ± 0.67 <sup>ac</sup>	3.62 ± 0.43 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 模型组; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs 辛伐他汀组.

1 : 1000)室温下振荡1 h, 再加入1 : 5000稀释的二抗(HRP-GAMG购自Bio-Rad公司)室温下孵育1 h, 放射自显影: 曝光5 min, 用密度扫描仪进行密度扫描, 测得其灰度值, 与相应的β-actin灰度之比表示其蛋白含量.

1.2.3 下丘脑STAT3蛋白组成性激活测定: 下丘脑取材组织称质量匀浆后抽提核蛋白, 步骤按试剂盒说明书, 以BCA法测定抽得的蛋白浓度. 制备60 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶. 按照EMSA试剂盒说明书, 每孔取抽提的核蛋白9.0 μg, 与缓冲液及探针混匀, 室温孵育20 min后, 上样电泳, 100 V, 1.5-2 h, 半干电转移(280 V, 1.5-2样电泳, 100将蛋白转至带阳性电荷的尼龙膜, 紫外灯交联后化学发光显色.

**统计学处理** 计量资料以mean ± SD表示, 组间比较采用方差分析; 等级资料采用秩和检验, 用SPSS12.0软件包进行数据统计.

## 2 结果

空白组大鼠精神充沛, 灵活好动, 皮毛整洁; 模型组大鼠精神萎靡, 性情较温顺, 不喜动, 皮毛凌乱欠光泽, 辛伐他汀组和降脂颗粒组大鼠活动均有不同程度的减少, 饮食减少, 皮毛欠光泽.

2.1 高脂饮食诱导NAFLD大鼠肝脏指数的变化 高脂饮食可诱导大鼠NAFLD模型, 表现为模型组大鼠肝重量增加, 肝脏指数明显升高; 各用药组均可以降低脂肪肝大鼠的肝指数, 与模型组比较有显著差异(*P* < 0.05, 表1).

2.2 高脂饮食诱导NAFLD大鼠肝脏病理学观察 空白对照组肝脏肉眼观察呈鲜红色, 边缘锐利, 表面光滑. 模型组肉眼见肝脏体积增大, 包膜紧张, 边缘变钝, 颜色呈土黄色, 质软, 与周围组织有粘连, 切面油腻状. 给药组部分肝脏表面呈浅黄色, 油腻状减轻, 指压有弹性. 肝组织切片HE染色可见正常对照组肝细胞条索排列整齐, 肝窦正常, 胞核清晰; 模型组则可见弥漫性肝细胞脂肪变性, 主要为大泡性也有部分小泡性脂肪

表 2 大鼠血清TG、TC改变

分组	n	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
空白组	8	1.68 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.07 <sup>a</sup>
模型组	10	2.84 ± 0.30	0.84 ± 0.09
辛伐他汀组	10	2.08 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.08 <sup>a</sup>
降脂颗粒组	10	1.85 ± 0.31 <sup>ac</sup>	0.54 ± 0.09 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 模型组; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs 辛伐他汀组.

变, 同时肝小叶内和汇管区有以大量单个核细胞为主的炎性细胞浸润; 降脂颗粒组肝组织脂肪变程度明显减轻, 肝内脂肪滴减少, 散在分布, 炎细胞浸润减少. 在改善脂肪变和抗炎方面均显著优于辛伐他汀组(图1, 表1).

2.3 高脂饮食诱导NAFLD大鼠血清TG、TC改变 模型组大鼠血清TG、TC数值明显升高, 降脂颗粒可明显下调血清TG、TC水平(*P* < 0.05), 并显著优于辛伐他汀组(*P* < 0.05, 表2).

2.4 高脂饮食诱导NAFLD大鼠下丘脑p-STAT3蛋白表达 正常组大鼠下丘脑p-STAT3蛋白表达为1.03 ± 0.02, 模型组大鼠下丘脑组织p-STAT3蛋白表达明显减少(0.49 ± 0.07), 辛伐他汀和降脂颗粒均可上调p-STAT3蛋白表达(0.62 ± 0.06, 0.83 ± 0.08, *P* < 0.05), 且降脂颗粒组优于辛伐他汀组(*P* < 0.05, 图2).

2.5 高脂饮食诱导NAFLD大鼠下丘脑STAT3蛋白组成性激活的改变 模型组大鼠下丘脑组织STAT3结合形式表达明显降低, 辛伐他汀及降脂颗粒均能不同程度的上调其表达(图3).

## 3 讨论

NAFLD是遗传和环境共同影响的疾病, 其发病的确切机制尚不清楚. 目前多数学者倾向于用“二次打击”学说解释NAFLD. “二次打击”学说认为胰岛素抵抗引起的脂肪在肝细胞沉积是NAFLD形成中的第一次打击, 第二次打击则是在脂肪沉积的基础上的脂质过氧化、氧

### ■创新盘点

本文主要基于降脂颗粒对NAFLD的改善效应, 探讨下丘脑组织中STAT3在NAFLD发病中的作用. 下丘脑存在摄食中枢, 调节食欲和代谢, 瘦素通过位于下丘脑信号分子将效应传达至靶器官, 但也有报道认为许多其他分子也参与这一过程.



### 应用要点

本研究证实瘦素通路蛋白STAT3在NAFLD的发病中发挥关键作用,而中药降脂颗粒可以调节STAT3蛋白,从而为NAFLD的机制研究提供一个新的研究思路,并为中药降脂颗粒的效应位点作出了新的探索。

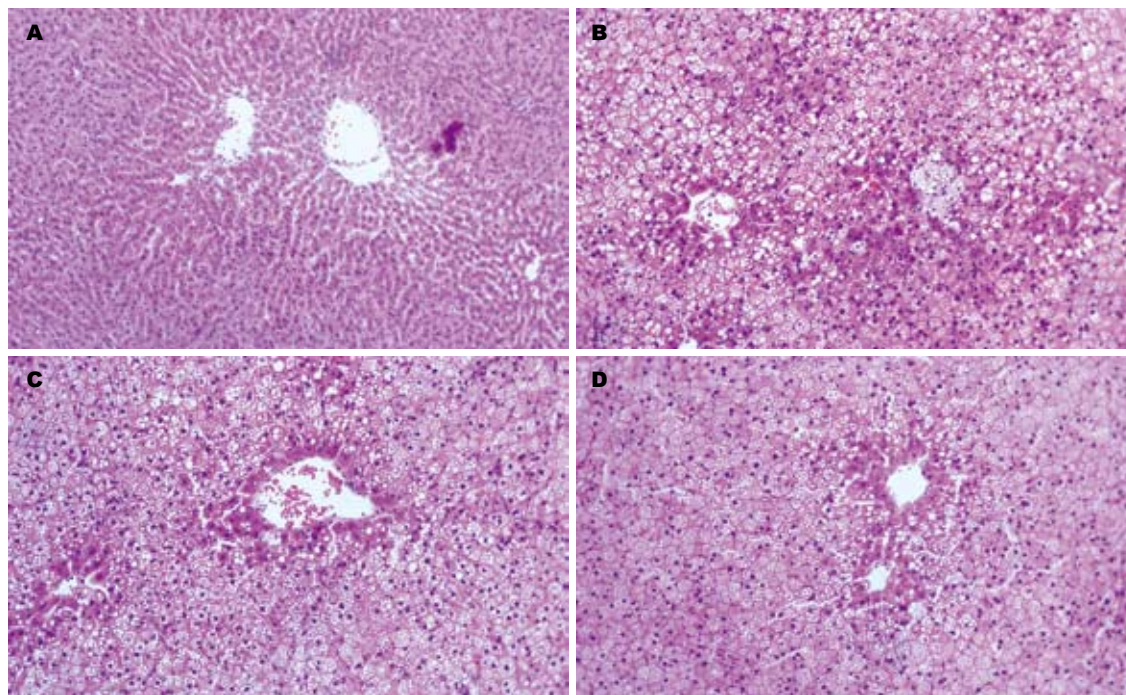


图1 各组大鼠肝脏病理学改变(HE × 100). A: 正常组; B: 模型组; C: 辛伐他汀组; D: 降脂颗粒组。

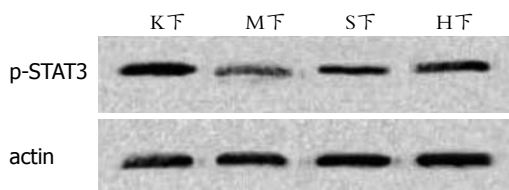


图2 大鼠下丘脑p-STAT3蛋白表达的变化。

化应激和异常的细胞因子等参与的炎症反应形成脂肪性肝炎。

NAFLD作为代谢性疾病,受到多种因素的调节。瘦素是由脂肪组织主要是脂肪细胞分泌的多肽类激素,他能将机体脂肪累积的信号传达至大脑,控制食欲和能量的消耗从而调节机体能量代谢<sup>[6-7]</sup>。研究表明,瘦素通过调节摄食和能量代谢在NAFLD的发病中发挥重要作用。

瘦素与其相应的受体(OB-R)结合发挥效应,OB-R属于I类细胞因子受体家族,现已发现OB-R的6种亚型:OB-Ra、OB-Rb、OB-Rc、OB-Rd、OB-Re、OB-Rf,其所有亚型都是由同一受体基因经mRNA交替剪接和/或蛋白酶解加工而成<sup>[8]</sup>。其中主要分布于下丘脑弓状核和腹内侧核的OB-Rb亚型在胞内段结构最长,是最主要的功能受体<sup>[9]</sup>。但瘦素受体本身不具备蛋白酪氨酸激酶的活性,通过激活Janus家族酪氨酸激酶/信号转导与转录激活因子(JAK/STAT),其中最主要是JAK2/STAT3途径产生生物学效应,发挥其控制食物摄入和调节能量代谢的作用<sup>[10-11]</sup>。

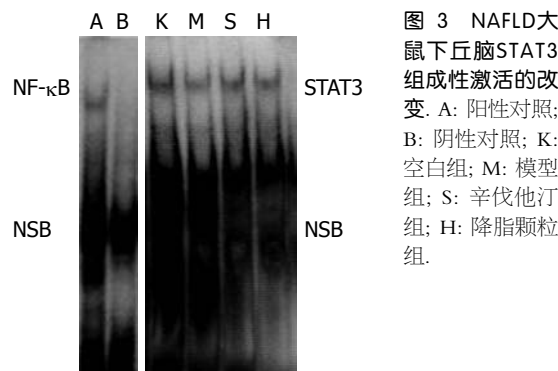


图3 NAFLD大鼠下丘脑STAT3组成性激活的改变。A: 阳性对照; B: 阴性对照; K: 空白组; M: 模型组; S: 辛伐他汀组; H: 降脂颗粒组。

OB-Rb与瘦素结合激活JAK2/STAT3信号通路,进而使STAT3发生磷酸化,形成二聚体穿过胞膜转位到胞核内,启动特定基因的表达,转录和翻译特定的蛋白,发挥调节机体代谢的效应<sup>[12]</sup>。

在瘦素信号转导过程中STAT3的活化是瘦素效应发挥的关键环节。刘倩琦 *et al*<sup>[13]</sup>用重组瘦素干预原代培养的新生大鼠下丘脑神经元,发现其磷酸化STAT3蛋白的表达增加,活性增强。Hosoi *et al*<sup>[14]</sup>将小鼠小丘脑神经核团的STAT3敲除后,观察小鼠发现其进食量增加,对瘦素的反应降低。而STAT3基因缺失或变异的小鼠均表现为病态肥胖<sup>[15]</sup>。

降脂颗粒全方由茵陈、虎杖、丹参、绞股蓝、干荷叶等5味中药组成。方中茵陈,味苦,性微寒,归脾胃肝胆经,清利湿热,退黄疸,虎杖味苦性寒,归肝胆肺经,活血定痛,清热利湿,解毒化痰,二者相合共为君,针对本病湿热痰瘀相互

胶着的病机, 可谓切中要害; 臣以三七, 味甘微苦, 性温, 归肝胃经, 具化瘀止血, 活血定痛之功, 因其性温可防诸药凉遏之弊, 与君药共奏澄本清源之力; 绞股蓝, 味甘、苦, 性寒, 归脾、肺经, 功效益气健脾, 化痰, 清热解毒为佐; 干荷叶, 味苦, 性平, 归肝、脾、胃经为使, 功能清热解暑, 升发清阳, 凉血止血, 《本草纲目》载: “荷叶服之令人瘦劣”, 诸药合用针对脂肪肝湿热痰瘀互结于肝的病机, 合奏清热利湿化痰、活血祛瘀之功, 故能取得较好的疗效. 以往对其研究发现降脂颗粒对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏脂质有较好的治疗作用, 并能通过增加肝脏瘦素受体mRNA表达及P-STAT3蛋白含量改善其瘦素抵抗状态<sup>[16]</sup>.

我们采用高脂饮食饲喂 $\delta$  SD大鼠, 观察其病理表现成功制备NAFLD大鼠模型后, 检测TG、TC的改变, 发现模型组明显高于正常组, 与组织学改变一致. 用药组与模型组相比明显数值降低, 降脂颗粒组效果更明显; 组织病理学的观察也表明药物可以改善肝脏脂肪变, 改善炎症细胞浸润. 血清学和组织学的观察都表明降脂颗粒对NAFLD有很好的治疗效果.

瘦素是脂代谢的关键调节因子之一, 我们推测瘦素参与NAFLD可能机制. 因此我们测定了下丘脑P-STAT3蛋白表达情况以及STAT3组成性激活的改变, 以证实我们假说的合理性. 结果表明模型组大鼠下丘脑P-STAT3蛋白表达明显下调. 药物干预后其表达均有不同程度的上调, 尤以降脂颗粒组为显著. 为了研究下丘脑STAT3组成性激活的改变我们采用EMSA用于检测. EMSA是一种研究DNA结合蛋白和其相关DNA结合序列相互作用的技术. 蛋白质可以与末端标记的核酸探针结合, 电泳时这种复合物比无蛋白结合的探针在凝胶中的泳动速度慢, 表现为相对滞后, 利用这个原理, 我们检测转录因子STAT3的组成性激活. 结果表明模型组STAT3条带灰度显著降低, 即STAT3的激活减少; 而用药组与模型组相比灰度增强. 说明STAT3参与了NAFLD形成过程, 而中药降脂颗粒则可通过增加STAT3的激活干预NAFLD.

近年来, 随着对中医药研究的深入, 中医药防治NAFLD的优越性逐渐被人们认识, 但是由于NAFLD机制的不明确以及中药复方的复杂性, 使得研究面临很大的困难. 在前期大量研究的基础上, 我们试图通过一个崭新的视角去探讨NAFLD的发病机制以及中药可能的干预位点. 但对其确切的机制还有待于进一步深入的研究.

## 4 参考文献

- 1 Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 2003; 24: 225-253
- 2 钟岚, 范建高, 王国良, 吴伟清, 史祺. 肥胖、高脂血症性脂肪肝炎症模型的建立. *实验动物科学与管理* 2000; 17: 16-20
- 3 Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1988; 95: 1056-1062
- 4 Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981; 1: 431-435
- 5 王泰龄, 刘霞, 周元平, 何静雯, 张晶, 李宁章, 段钟平, 王宝恩. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案. *中华肝病杂志* 1998; 66: 195-197
- 6 Huo L, Maeng L, Bjørbaek C, Grill HJ. Leptin and the control of food intake: neurons in the nucleus of the solitary tract are activated by both gastric distension and leptin. *Endocrinology* 2007; 148: 2189-2197
- 7 Peters JH, Simasko SM, Ritter RC. Leptin analog antagonizes leptin effects on food intake and body weight but mimics leptin-induced vagal afferent activation. *Endocrinology* 2007; 148: 2878-2885
- 8 Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett* 1996; 392: 87-90
- 9 Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763-770
- 10 Saxena NK, Vertino PM, Anania FA, Sharma D. leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *J Biol Chem* 2007; 282: 13316-13325
- 11 Ben-Eliezer M, Phillip M, Gat-Yablonski G. Leptin regulates chondrogenic differentiation in ATDC5 cell-line through JAK/STAT and MAPK pathways. *Endocrine* 2007; 32: 235-244
- 12 Bahrenberg G, Behrmann I, Barthel A, Hekerman P, Heinrich PC, Joost HG, Becker W. Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 859-872
- 13 刘倩琦, 陈荣华, 郭锡熔, 潘晓勤. 重组Leptin干预对新生鼠下丘脑中STAT3磷酸化蛋白表达的影响. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2006; 26: 86-89
- 14 Hosoi T, Okuma Y, Ono A, Nomura Y. Alteration of leptin-induced STAT3 activation in the brain of senescence-accelerated mouse (SAM) P8. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 1514-1516
- 15 Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, Fu XY. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4661-4666
- 16 马赞颂, 柳涛, 郑培永, 刑练军, 季光. 中药降脂颗粒对非酒精性脂肪肝大鼠肝脏瘦素受体mRNA及P-JAK2/P-STAT3的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 3360-3366

## ■同行评价

本研究设计合理, 方法先进, 统计正确, 结果可信, 学术价值较好.

# 吡格列酮对SD大鼠非酒精性脂肪肝病形成的预防作用及其机制

张佳妮, 陈金虎, 谭莺, 刘慧霞

## ■背景资料

在全球, 非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 的发病率不断增高且起病渐趋低龄化, 已成为发达国家和我国富裕地区慢性肝病的首要病因。目前认为 NAFLD 是 MS 在肝脏的表现, 可导致肝硬化、肝癌、肝功能衰竭。NAFLD 的高发病率及对人类的危害已成为全球医学关注和研究的热点。

张佳妮, 陈金虎, 谭莺, 刘慧霞, 中南大学湘雅医院老年病科 湖南省长沙市 410078

张佳妮, 中南大学湘雅医院博士, 主要从事代谢综合征及相关疾病研究。

作者贡献分布: 张佳妮与陈金虎对此文所作贡献均等; 本研究由张佳妮、陈金虎及刘慧霞共同设计; 实验流程操作由张佳妮、陈金虎及谭莺完成; 数据分析由张佳妮与陈金虎完成; 本论文写作由张佳妮、陈金虎及刘慧霞完成。

通讯作者: 刘慧霞, 410078, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院老年病科。lhx900@yahoo.com.cn

电话: 0731-4327332 传真: 0731-4327332

收稿日期: 2008-12-25 修回日期: 2009-02-01

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-18

## Preventive effect of pioglitazone against nonalcoholic fatty liver disease in Sprague-Dawley rats and its mechanism

Jia-Ni Zhang, Jin-Hu Chen, Ying Tan, Hui-Xia Liu

Jia-Ni Zhang, Jin-Hu Chen, Ying Tan, Hui-Xia Liu, Department of Geriatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China

Correspondence to: Professor Hui-Xia Liu, Department of Geriatrics, Xiangya Hospital, Central South University, 87 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. lhx900@yahoo.com.cn

Received: 2008-12-25 Revised: 2009-02-01

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To explore the prevention effect and mechanism of pioglitazone (PIO) on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats.

**METHODS:** Seventy two Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: normal diet group (NG), high fat diet group (HG) and PIO group (PIOG), with 24 rats in every group. PIOG were fed with high fat diet and PIO for eight weeks. IR was tested by euglycemic-hyperinsulinemic clamp; TG, ALT, AST, FFAs, FINS and TNF- $\alpha$  were tested by biochemistry automatic analyzer or RIA; mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) was detected using RT-PCR. The expression of PPAR $\gamma$  and c-Jun amino-terminal kinase 1 (JNK1) were detected by Western blot.

**RESULTS:** The glucose infusion rate (GIR) decreased and JNK1 increased in HG rats in a time-dependent manner from 1<sup>st</sup> to 8<sup>th</sup> week ( $P < 0.05$ ). Compared with NG, at the end of 8<sup>th</sup> week, the hepatic steatosis was significant in HG group. The weight, liver index, serum levels of TG, ALT, AST, FFAs, FINS and TNF- $\alpha$  increased, while IR was aggravated. Meanwhile, the JNK1 protein expression in liver tissue was up-regulated, while expression of PPAR $\gamma$  was decreased (TG:  $1.23 \pm 0.08$  vs  $0.62 \pm 0.12$ ; ALT:  $92.80 \pm 7.09$  vs  $51.34 \pm 8.12$ ; AST:  $153.22 \pm 20.65$  vs  $119.26 \pm 13.61$ ; FFAs:  $511.94 \pm 24.88$  vs  $335.31 \pm 15.71$ ; FINS:  $41.23 \pm 1.84$  vs  $22.65 \pm 2.25$ ; TNF- $\alpha$ :  $1.02 \pm 0.12$  vs  $0.34 \pm 0.07$ , all  $P < 0.05$ ). In PIOG, all the indexes were improved, but didn't completely return to the same as those of NG group.

**CONCLUSION:** PIO could prevent NAFLD induced by a high-fat diet and other IR-related diseases.

**Key Words:** c-Jun amino-terminal kinase 1; Nonalcoholic fatty liver disease; Insulin resistance; Pioglitazone

Zhang JN, Chen JH, Tan Y, Liu HX. Preventive effect of pioglitazone against nonalcoholic fatty liver disease in Sprague-Dawley rats and its mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 758-764

## 摘要

**目的:** 探讨吡格列酮(pioglitazone, PIO)对SD大鼠非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)形成的干预作用及机制。

**方法:** ♂ SD大鼠72只, 随机分为正常饮食组(NG)、高脂饮食组(HG)和PIO干预组(PIOG)各24只。PIOG喂饲高脂饲料, 并同时予PIO药物灌胃8 wk。正糖高胰岛素钳夹实验检测IR水平, 放免法和全自动生化仪检测血清生化指标, RT-PCR检测过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) mRNA表达, Western blot检测肝组织c-Jun氨基末端激酶(c-Jun amino-terminal

## ■同行评议者

高泽立, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科; 沈薇, 教授, 重庆医科大学附属第二医院消化内科



kinase 1, JNK1)和PPAR $\gamma$ 蛋白表达.

**结果:** HG大鼠GIR水平降低和JNK1蛋白表达增高, 均呈明显时间依赖性(均 $P<0.05$ ); 8 wk末HG大鼠肝细胞出现明显脂肪变性, 与NG相比, 体质量、肝指数, TG、ALT、AST、FFAs、FINS、TNF- $\alpha$ 水平明显增高, IR加重, JNK1蛋白表达明显升高, 肝组织PPAR $\gamma$ 表达明显降低(TG:  $1.23\pm0.08$  vs  $0.62\pm0.12$ , ALT:  $92.80\pm7.09$  vs  $51.34\pm8.12$ ; AST:  $153.22\pm20.65$  vs  $119.26\pm13.61$ ; FFAs:  $511.94\pm24.88$  vs  $335.31\pm15.71$ ; FINS:  $41.23\pm1.84$  vs  $22.65\pm2.25$ ; TNF- $\alpha$ :  $1.02\pm0.12$  vs  $0.34\pm0.07$ , 均 $P<0.05$ ); 而PIOG大鼠, 上述各项指标均得到明显改善, 但仍不能完全达到NG大鼠水平(均 $P<0.05$ ).

**结论:** PIO对于由高脂饮食诱导的NAFLD的形成及其他IR相关疾病有预防作用.

**关键词:** c-Jun氨基末端激酶; 非酒精性脂肪肝病; 胰岛素抵抗; 吡格列酮

张佳妮, 陈金虎, 谭莺, 刘慧霞. 吡格列酮对SD大鼠非酒精性脂肪肝病形成的预防作用及其机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 758-764

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/758.asp>

## 0 引言

随着人们日常膳食中以脂肪为代表的高热量食物成分所占比例明显增加, 非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率呈逐年上升趋势. 目前发达国家成年人口患病率为20%-30%, 发展中国家人口患病率也明显增加<sup>[1-2]</sup>, 同时在肥胖及2型糖尿病(diabetes mellitus, DM)患者中更高达60%-75%左右. 目前认为NAFLD是代谢综合征(metabolic syndrome, MS)的重要组成部分, 是MS在肝脏的表现<sup>[3-5]</sup>, 他不但使肝脏对其他损伤因素更加易感, 且与MS、DM相关的心脑血管疾病的发生、发展及死亡密切相关<sup>[4,6-7]</sup>. 因此, NAFLD的高发病率及对人类的危害已成为全球医学关注和研究的热点.

研究表明, NAFLD与胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)密切相关, 而IR可能在NAFLD形成中起关键作用<sup>[8-10]</sup>. 因此, 目前虽无肯定的NAFLD防治方法, 但改善IR可能成为防治NAFLD的一个主要方向<sup>[11]</sup>. 吡格列酮(pioglitazone, PIO)作为噻唑烷二酮类(thiozolidinediones, TZDs)胰岛素(insulin, INS)

增敏剂, 可改善大鼠由高脂饮食喂养所产生的IR, 但具体机制尚不清楚<sup>[12]</sup>. c-Jun氨基末端激酶(c-Jun amino-terminal kinase, JNK)信号通路是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)家族中重要的通路<sup>[13,13-14]</sup>, 由肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等炎症因子激活, 对INS信号传导的负向调节起重要作用<sup>[15-16]</sup>. 而TNF- $\alpha$ 主要通过JNK信号通路作用于INS信号通路而产生IR. 据报道TZDs可以同时对抗体内与体外因TNF- $\alpha$ 诱导而产生的IR<sup>[17-21]</sup>, 但PIO与JNK有何联系, JNK在NAFLD形成中有什么作用尚不完全清楚. 故在本研究中, 我们使用PIO进行干预, 观察其对JNK信号通路、IR和脂代谢的影响, 及其预防NAFLD形成的分子机制, 为NAFLD预防提供新的思路 and 手段.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SD大鼠72只, 体质量100-120 g, 均为 $\delta$ . 购自中南大学湘雅医学院实验动物中心. 主要试剂和仪器包括: 凯基全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技有限公司)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(美国Sigma公司)、离心机(德国Eppendorf公司)、蛋白电泳转移槽(美国Biorad公司)、PPAR $\gamma$ 抗体(美国CST公司)、JNK1小鼠IgG mAb(美国R&D公司)、驴抗鼠二抗及羊抗兔二抗(美国Sant Cruz公司)、Olympus光学显微镜(日本Olympus公司)、-70℃低温冰箱(德国西门子公司)、ECL发光检测盒(南京凯基生物科技有限公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的建立:** 实验大鼠随机分为3组: 正常饮食组(NG)、高脂饮食组(HG)和PIO干预组(PIOG), 每组各24只. NG喂饲普通饲料, 其蛋白质、脂肪、碳水化合物提供能量分别为21.52%, 19.03%, 59.45%; HG及PIOG均喂饲高脂饲料, 其蛋白质、脂肪、碳水化合物提供能量分别为14.81%, 44.84%, 40.35%. 三组分别于1 wk和4 wk末随机抽取6只大鼠, 进行正糖高胰岛素钳夹实验(钳夹实验), 观察其IR情况, 处死后留取肝组织标本作相关检测. 8 wk末从三组中随机抽取6只大鼠, 进行钳夹实验, 其余大鼠抽取门静脉血作相关指标检测, 处死后留取肝组织标本观察病理变化及相关指标检测. PIOG从实验第1 wk开始给予PIO药物ig, 剂量为10 mg/(kg·d), PIO碾成粉末后, 用生理盐水配置成悬浊液, 浓度为10 g/L; NG和HG大鼠用生理盐

## ■ 研究前沿

研究表明, NAFLD与IR密切相关, 而IR可能在NAFLD形成中起关键作用. 因此, 目前虽无肯定的NAFLD防治方法, 但改善IR可能成为防治NAFLD的一个主要方向. 吡格列酮可改善大鼠由高脂饮食喂养所产生的IR, 但具体机制尚不清楚.



### ■创新盘点

本研究旨在使用PIO对由高脂饮食诱导的NAFLD进行干预,观察其对JNK信号通路、IR和糖脂代谢的影响,及其预防NAFLD形成的分子机制。研究表明,使用PIO预防NAFLD形成的可能机制为:激活肝组织PPAR $\gamma$ 的表达,降低TNF- $\alpha$ 和FFAs水平,改善脂代谢异常,并通过JNK信号通路,拮抗JNK1蛋白表达,调控INS信号通路,从而延缓或防止IR的产生,进而延缓NAFLD的发生。

表 1 血清各项指标的变化

分组	TG (mmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)	FFAs (U/mg)	FBS (mmol/L)	FINS (mU/L)
NG	0.62 $\pm$ 0.12	51.34 $\pm$ 8.12	119.26 $\pm$ 13.61	0.34 $\pm$ 0.07	335.31 $\pm$ 15.71	4.58 $\pm$ 0.56	22.65 $\pm$ 2.25
HG	1.23 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	92.80 $\pm$ 7.09 <sup>a</sup>	153.22 $\pm$ 20.65 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	511.94 $\pm$ 24.88 <sup>a</sup>	5.05 $\pm$ 0.74	41.23 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>
PIOG	0.79 $\pm$ 0.09 <sup>ac</sup>	60.12 $\pm$ 8.01 <sup>ac</sup>	130.24 $\pm$ 11.57 <sup>ac</sup>	0.73 $\pm$ 0.08 <sup>ac</sup>	401.26 $\pm$ 19.39 <sup>ac</sup>	4.58 $\pm$ 0.87	25.08 $\pm$ 2.52 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NG; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs HG.

水作为安慰剂ig,每天上午9时左右灌胃给药。

1.2.2 血清生化指标检测:血清甘油三酯(TG)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、空腹血糖(FBS)、游离脂肪酸(FFAs)均使用全自动生化分析仪检测;空腹胰岛素(FINS)、TNF- $\alpha$ 检测采用放免法由全自动放免 $\gamma$ 测量仪测定。

1.2.3 病理学检查:部分新鲜肝组织以100 g/L甲醛溶液固定,制成石蜡切片,采用HE染色;部分制成冰冻切片,采用苏丹三染色。均由2个病理科医生在光学显微镜下检查,作出双盲判断。每张切片观察5个肝小叶,以平均每个肝小叶内脂肪变性的肝细胞所占百分比表示肝脏脂肪变性程度。根据美国肝病协会(AASLD)2002年拟定的NAFLD诊断标准中的组织学诊断标准<sup>[22]</sup>进行。

1.2.4 IR水平判定:采用评价IR的金标准即正糖高胰岛素钳夹实验(钳夹实验)<sup>[23]</sup>评价INS敏感性,方法为:大鼠均禁食过夜12 h,用戊巴比妥钠1 mg/kg ip麻醉后,进行颈动脉和颈静脉插管并留置。INS和葡萄糖分别用两个微电脑数字式微量泵由颈静脉泵入,血液标本由颈动脉导管获取。INS输注率为10.0 mU/(kg·min),从颈动脉取血,用微型血糖仪检测血糖值,维持稳态血糖在5.0  $\pm$  0.5 mmol/L的范围内,持续上述过程达2 h完成。钳夹实验结束后,计算灌流2 h的葡萄糖输注率(glucose infusion rate, GIR),判断大鼠的INS敏感性。

1.2.5 RT-PCR检测肝组织PPAR $\gamma$  mRNA表达:使用TRIzol试剂盒从SD大鼠肝组织中提取总RNA,逆转录获得cDNA。PPAR $\gamma$  mRNA上游引物5'-CCTTGCTGTGGGGATGTCTC-3',下游引物5'-CAGCGGGAAGGACTTTATGTATGA-3',产物为175 bp; GAPDH mRNA上游引物5'-TTC TTGTGCAGTGCCAGCCTCGTC-3',下游引物5'-GCCGTTGAAGTTCGCGTGGGTAGA-3',产物为203 bp。取1.5  $\mu$ L cDNA和相应引物在Taq合成酶作用下扩增,先预变性4 min,共扩增35个循环,每个循环包括94 $^{\circ}$ C变性40 s $\rightarrow$ 58 $^{\circ}$ C退火1

min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C延伸1 min,最后在72 $^{\circ}$ C再延伸10 min。PCR产物通过含溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳,应用Gel Doc2000凝胶分析系统扫描分析,通过软件分析光密度值。

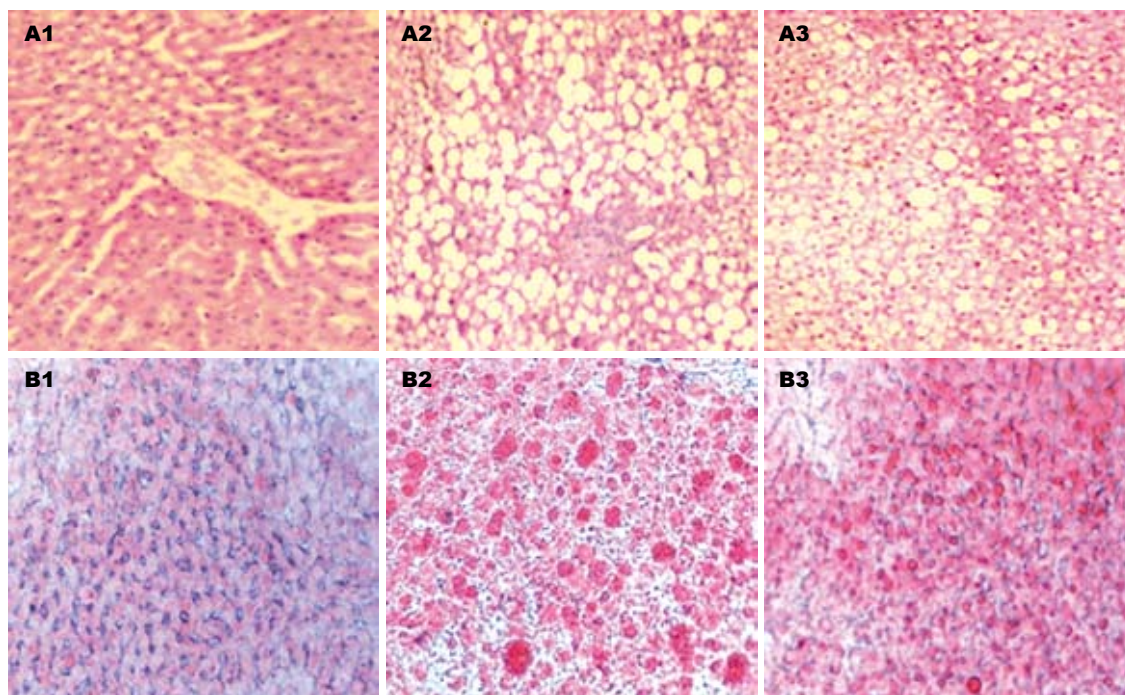
1.2.6 Western blot检测PPAR $\gamma$ 和JNK1蛋白表达:取肝右叶组织100 mg,使用凯基全蛋白提取试剂盒4 $^{\circ}$ C匀浆后提取胞质蛋白,BCA法测定蛋白浓度。蛋白变性后,行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至PVDF膜,50 g/L脱脂奶粉室温封闭2 h,分别加入PPAR $\gamma$ 抗体(1:750)和JNK1抗体(1:500),室温作用2 h,洗涤后加入辣根过氧化物酶结合的抗鼠IgG(1:4000),作用1 h再洗膜。然后化学发光试剂检测,X光片显影。定量分析采用分子生物学图像分析系统测定各目的带积分灰度值,所测结果为扣除背景的积分吸光度。

**统计学处理** 计量资料均以mean  $\pm$  SD表示,采用秩和检验, $P < 0.05$ 有统计学差异。应用SPSS12.0统计软件进行数据处理分析。

## 2 结果

2.1 血清生化指标检测 8 wk末,与NG相比,HG大鼠的TG,ALT,AST,FFAs,FINS和TNF- $\alpha$ 均明显增高,比较有显著性差异(均 $P < 0.05$ );使用PIO干预组,与HG相比,TG,ALT,AST,FFAs,FINS和TNF- $\alpha$ 均明显降低,但仍高于NG,两两比较均有显著性差异(均 $P < 0.05$ );HG,NG和PIOG大鼠的FBS相近,两两比较均无显著性差异( $P > 0.05$ ,表1)。

2.2 肝组织病理学变化 8 wk末,光镜下HE染色可见NG肝索结构正常,无肝细胞脂肪变性和炎症细胞浸润;HG出现以大泡性为主的脂肪变性,胞质中有大量脂滴空泡,核居边,偶可见小叶内炎症细胞浸润;而PIOG偶可见散在脂肪变性,但无炎症细胞浸润。苏丹三染色见HG肝细胞内有大量橘红色脂滴,肝小叶内脂肪变性的肝细胞所占比例为40.27%  $\pm$  3.62%,达到了脂肪肝的标准;而PIOG仅可见散在分布的橘红色脂滴,未达



#### ■应用要点

本实验通过多角度探讨PIO对于由高脂饮食诱导的NAFLD的形成的预防作用, 为进一步研究PIO对NAFLD发生和发展中INS信号通路的影响, 及IR和相关疾病的防治开辟了新的思路。

图1 肝组织病理学变化. A: HE染色下各组大鼠肝组织的形态学变化(100×); B: 苏丹三染色下各组大鼠肝组织的形态学变化(100×); 1: NG肝组织形态学表现; 2: HG肝脂肪变性; 3: PIOG肝脂肪变性.

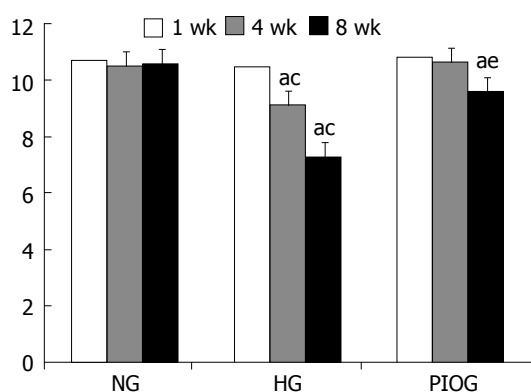


图2 各组不同时期GIR水平变化. <sup>a</sup> $P<0.05$  vs 同期NG; <sup>e</sup> $P<0.05$  vs PIOG; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 同期HG.

到脂肪肝标准(图1).

**2.3 钳夹实验** HG大鼠1、4、8 wk GIR[mg/(kg·min)]水平随喂养时间延长而逐渐降低, 两两比较有显著性差异(均 $P<0.05$ ); 1 wk末, 三组大鼠GIR水平比较无显著性差异; 4 wk末, 与NG和PIOG比较, HG大鼠GIR水平降低, 比较有显著性差异( $P<0.05$ ), 而NG和PIOG大鼠GIR水平无明显下降, 比较无显著性差异; 8 wk末, 与NG和PIOG比较, HG大鼠GIR水平明显降低, 比较有显著性差异( $P<0.05$ ), 而PIOG大鼠GIR水平较HG增高, 但低于NG, 两两比较均有显著性差异( $P<0.05$ , 图2).

**2.4 肝组织PPAR $\gamma$  mRNA及蛋白表达** HG大鼠

8 wk末与NG比较, PPAR $\gamma$  mRNA和蛋白表达明显减低, 比较有显著性差异( $P<0.05$ ), PIO干预能明显增强高脂饮食引起的PPAR $\gamma$  mRNA和蛋白表达, 但仍低于NG, 两两比较有显著性差异( $P<0.05$ , 图3).

**2.5 肝组织JNK1蛋白表达** HG大鼠1、4、8 wk JNK1蛋白表达随喂养时间的延长而逐渐增强, 两两比较有显著性差异(均 $P<0.05$ ); 8 wk末, 与NG和PIOG比较, HG大鼠肝组织JNK1蛋白表达明显增高, 比较有显著性差异( $P<0.05$ ); 而PIO干预后, JNK1蛋白表达较HG明显降低, 但仍高于NG, 两两比较有显著性差异( $P<0.05$ , 图4-5).

### 3 讨论

本研究通过高脂饲料饲养SD大鼠8 wk, 成功构建了SD大鼠NAFLD模型. 该模型的代谢特征为IR、高INS血症、高脂血症、血清转氨酶升高. 与其他研究脂肪肝的动物模型(如先天性、转基因、化学物质诱导等方法<sup>[24-28]</sup>)相比, 高脂饮食诱导NAFLD大鼠模型具备人类脂肪肝特征, 造模方法简便易行, 模型形成率高. 故本研究采用的是单纯高脂饮食来构建动物NAFLD模型<sup>[29]</sup>.

研究表明: NAFLD的发生、发展是由于“二次打击”所引起<sup>[30-32]</sup>, 而IR贯穿于这“二次打击”的始终, 并起关键作用<sup>[28]</sup>. IR又与TNF- $\alpha$ 产生异常及脂代谢失调等相互作用促进

### 同行评价

本文选题较新颖,从体内外实验探讨吡格列酮对SD大鼠非酒精性脂肪肝病形成的预防作用及机制,值得临床医生阅读。

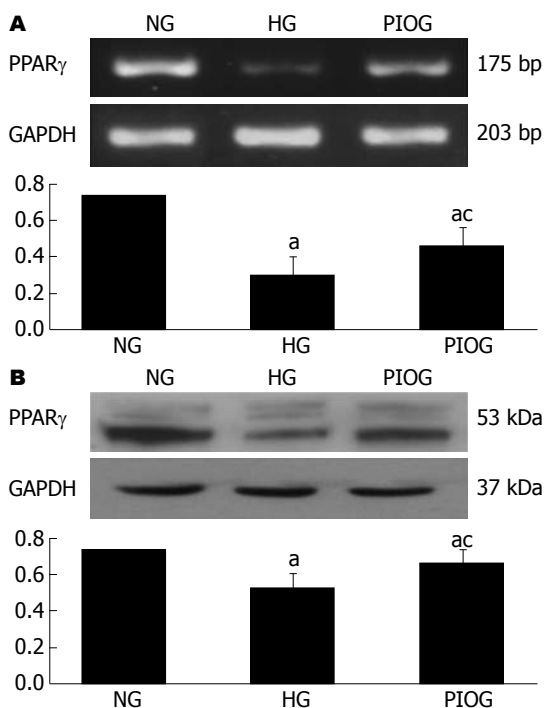


图3 8 wk末各组大鼠肝组织PPAR $\gamma$  mRNA及蛋白表达。A: mRNA; B: 蛋白; <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NG; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs HG。

了NAFLD的发生发展。因此,构建具有IR特征的NAFLD动物模型也就显得尤为重要。研究结果显示:INS代谢信号通路的信号转导过程中任何环节发生障碍均可引起IR,而绝大多数IR是INS与INS受体结合后信号传导过程发生障碍,即INS受体后缺陷的结果。胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRSs)是INS敏感组织中一组与INS生物效应调节关系极为密切的信号蛋白,其中IRS-1丝氨酸307位点的过度磷酸化对INS信号传递发挥着极为重要的负性调控作用<sup>[33-35]</sup>。但IRS-1丝氨酸307位点的磷酸化水平受到JNK的调控。JNK是一种重要的蛋白激酶,他可以被TNF- $\alpha$ 、FFAs等多种因素激活。研究表明,JNK信号通路在NAFLD形成中起重要作用。由于IRSs蛋白分子含有JNK1结合基本序列,故增高的JNK1可与IRS1蛋白结合,并诱导IRS-1丝氨酸307位点的磷酸化水平增高,抑制IRSs正常的酪氨酸磷酸化,干扰INS信号经INS受体/IRSs/PI3-K通路下传至效应器,进而诱发IR<sup>[36-37]</sup>。我们的研究发现,在高脂饮食诱导NAFLD动物模型至4 wk时,JNK1蛋白表达就已增高,IR也已出现,且JNK1蛋白表达的增强与IR的加重均呈明显的时间依赖性。同时我们也发现,使用PIO对高脂喂养大鼠进行干预,4 wk时JNK1的表达并没有明显的增强,IR也没有出现,而即使到8 wk末,该

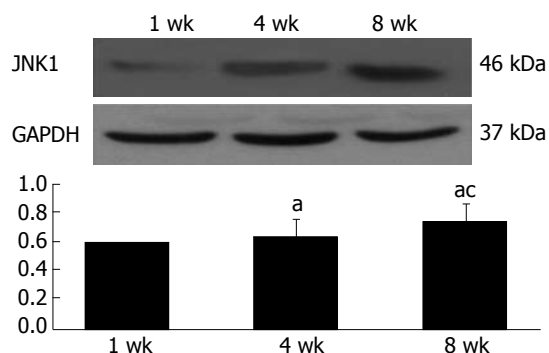


图4 HG不同时期肝组织JNK1蛋白表达。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 1 wk; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 4 wk。

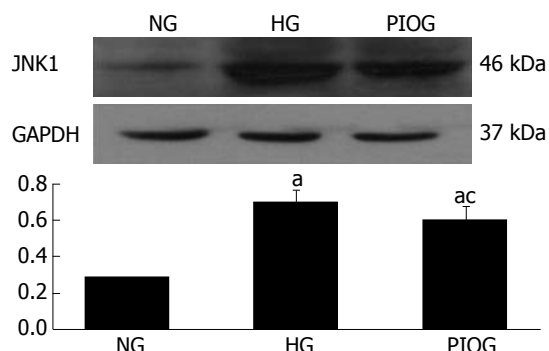


图5 8 wk末各组大鼠肝组织JNK1蛋白表达。<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NG; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs HG。

组大鼠IR程度仍明显较HG大鼠轻,虽然肝组织有肝脂肪变性,但仍未达到NAFLD诊断标准。以上结果说明,高脂饮食可使JNK1蛋白表达增强,而增强的JNK1通过负向调控INS信号转导通路,可诱导IR的产生。而PIO可以阻止由高脂饮食喂养导致的JNK1蛋白表达增强,从而抑制IR,最终延缓NAFLD的发生。

目前认为TNF- $\alpha$ 是引起机体的IR和介导肝损伤的主要细胞因子,并且在NAFLD的发病中起重要作用<sup>[21,38]</sup>。而TNF- $\alpha$ 、FFAs和脂代谢异常主要通过作用于细胞内JNK通路,引起肝脏JNK1表达增高,减弱INS的生理作用,导致IR。在本实验NAFLD SD大鼠血清中,TNF- $\alpha$ 、FFAs和血脂水平均升高,证实TNF- $\alpha$ 、FFAs和脂代谢参与了NAFLD的形成,推测其可能机制为:TNF- $\alpha$ 和FFAs的表达增加及脂代谢的异常,激发了细胞内JNK通路,导致JNK1蛋白表达明显增高,进而产生和加重了IR。而8 wk末,尽管PIOG大鼠血清TNF- $\alpha$ 、FFAs和血脂水平较NG大鼠增高,但明显低于HG大鼠,证明由于PIO的干预,使TNF- $\alpha$ 、FFAs和脂代谢异常得到了部分改善。

PPAR $\gamma$ 是脂肪细胞基因表达和INS细胞内

信号传递的主要调节者, 参与脂肪细胞分化和糖脂代谢调节, 与IR密切相关. Kawaguchi *et al*<sup>[17]</sup>在食物诱导的肥胖伴肝纤维化大鼠中发现, 肝脏PPAR $\gamma$ 表达及活性均降低, PPAR $\gamma$ 的高效激动剂PIO治疗不仅改善了肝纤维化, 还提高了肝脏PPAR $\gamma$ 的表达及活性. 我们的研究显示, 高脂饮食诱导大鼠NAFLD模型中, 肝组织PPAR $\gamma$  mRNA和蛋白表达均明显减低, 而使用PIO能激活肝组织PPAR $\gamma$ , 使PPAR $\gamma$ 表达增强, 与Kawaguchi *et al*的结果一致. 研究显示, TZDs对INS信号通路的调节作用主要通过JNK信号通路发挥作用<sup>[39]</sup>. 在遗传和饮食诱导的肥胖和糖尿病小鼠模型中, 与TZDs的作用相似, JNK抑制剂能够降低血糖及血浆INS水平, 改善糖耐量异常<sup>[40-41]</sup>; 而对敲除了JNK基因的ob/ob JNK $^{-/-}$ 小鼠原代脂肪细胞的研究发现, 罗格列酮并不能改善糖的摄取, 证实TZDs的降糖作用主要通过JNK通路发挥作用, 这与我们的实验结果相一致, 即本研究使用PIO干预后, PPAR $\gamma$ 的表达上调, 并通过拮抗JNK1的蛋白表达, 改善了IR, 病理学证实延缓了NAFLD的发生. 但在我们的实验中, 高脂喂养大鼠8 wk并未对血糖产生明显影响, 其原因有待进一步研究阐明.

近年来国内外对PIO抗肝组织脂肪变性和炎症细胞浸润作用的研究进一步深入, 其作用机制主要包括: 特异性地作用于PPAR $\gamma$ , 调节糖脂代谢, 进而改善IR<sup>[19]</sup>; 改善脂肪组织的INS敏感性, 减轻肝细胞的脂肪沉积; 减少肝脏氧自由基的产生, 抑制脂质过氧化, 减轻肝组织炎症细胞浸润及肝细胞坏死, 延缓肝纤维化<sup>[19-20]</sup>. 本实验不但进一步证实了高脂饮食能减低肝组织PPAR $\gamma$ 的表达, 使用PIO干预, 能激活肝组织PPAR $\gamma$ , 且探讨了PIO预防NAFLD形成的可能机制为: PIO的干预能激活肝组织PPAR $\gamma$ 的表达, 降低TNF- $\alpha$ 和FFAs水平, 改善脂代谢异常, 并通过JNK信号通路, 拮抗JNK1蛋白表达, 调控INS信号通路, 从而达到延缓或防止IR的产生及肝组织脂肪变性, 进而延缓NAFLD的发生. 总之, PIO对NAFLD的作用是多方面的, 而通过进一步研究PIO对NAFLD发生和发展中INS信号通路的影响的研究, 必定能为IR及相关疾病的防治开辟新的思路.

#### 4 参考文献

- 1 Socha P, Wierzbicka A, Neuheoff-Murawska J, Włodarek D, Podleśny J, Socha J. Nonalcoholic fatty liver disease as a feature of the metabolic syndrome.

- Rocz Panstw Zakl Hig* 2007; 58: 129-137
- 2 Preiss D, Sattar N. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview of prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment considerations. *Clin Sci (Lond)* 2008; 115: 141-150
- 3 Boppidi H, Daram SR. Nonalcoholic fatty liver disease: hepatic manifestation of obesity and the metabolic syndrome. *Postgrad Med* 2008; 120: E01-E07
- 4 Khashab MA, Liangpunsakul S, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease as a component of the metabolic syndrome. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 73-80
- 5 Hjelkrem MC, Torres DM, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease. *Minerva Med* 2008; 99: 583-593
- 6 Abel T, Fehér J. [Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk] *Orv Hetil* 2008; 149: 1299-1305
- 7 Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 171-180
- 8 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: 32345-32353
- 9 Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219
- 10 Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 575-594, ix
- 11 Bugianesi E, Zannoni C, Vanni E, Marzocchi R, Marchesini G. Non-alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause-effect relationship? *Dig Liver Dis* 2004; 36: 165-173
- 12 Seo YS, Kim JH, Jo NY, Choi KM, Baik SH, Park JJ, Kim JS, Byun KS, Bak YT, Lee CH, Kim A, Yeon JE. PPAR agonists treatment is effective in a nonalcoholic fatty liver disease animal model by modulating fatty-acid metabolic enzymes. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 102-109
- 13 Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension* 2005; 45: 828-833
- 14 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410: 37-40
- 15 Arner P. Insulin resistance in type 2 diabetes -- role of the adipokines. *Curr Mol Med* 2005; 5: 333-339
- 16 Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 447-455
- 17 Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K. Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 187-195
- 18 Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, Suzuki Y, Saito H, Kohgo Y, Okumura T. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 215-222
- 19 Diehl AM. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and



- cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G1-G5
- 20 Froh M, Thurman RG, Wheeler MD. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G856-G863
- 21 Diehl AM. Tumor necrosis factor and its potential role in insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 619-638, x
- 22 Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1705-1725
- 23 Kraegen EW, James DE, Bennett SP, Chisholm DJ. In vivo insulin sensitivity in the rat determined by euglycemic clamp. *Am J Physiol* 1983; 245: E1-E7
- 24 Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med* 2000; 6: 998-1003
- 25 Yin HQ, Kim M, Kim JH, Kong G, Lee MO, Kang KS, Yoon BI, Kim HL, Lee BH. Hepatic gene expression profiling and lipid homeostasis in mice exposed to steatogenic drug, tetracycline. *Toxicol Sci* 2006; 94: 206-216
- 26 Chung H, Hong DP, Kim HJ, Jang KS, Shin DM, Ahn JI, Lee YS, Kong G. Differential gene expression profiles in the steatosis/fibrosis model of rat liver by chronic administration of carbon tetrachloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 208: 242-254
- 27 Teramoto K, Bowers JL, Khettry U, Palombo JD, Clouse ME. A rat fatty liver transplant model. *Transplantation* 1993; 55: 737-741
- 28 Blanc MC, Moinard C, Béziel A, Darquy S, Cynober L, De Bandt JP. Arginine and glutamine availability and macrophage functions in the obese insulin-resistant Zucker rat. *J Cell Physiol* 2005; 202: 153-159
- 29 Cha MC, Chou CJ, Boozer CN. High-fat diet feeding reduces the diurnal variation of plasma leptin concentration in rats. *Metabolism* 2000; 49: 503-507
- 30 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 31 Blechacz B, Stremmel W. [NASH -- nonalcoholic steatohepatitis] *Z Gastroenterol* 2003; 41: 77-90
- 32 Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 27-41
- 33 Burén J, Liu HX, Lauritz J, Eriksson JW. High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase B desensitisation in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 157-167
- 34 Burén J, Liu HX, Jensen J, Eriksson JW. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 419-429
- 35 Greene MW, Garofalo RS. Positive and negative regulatory role of insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1 and IRS-2) serine/threonine phosphorylation. *Biochemistry* 2002; 41: 7082-7091
- 36 Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 85-96
- 37 Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 2000; 275: 9047-9054
- 38 Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40: 46-54
- 39 Díaz-Delfín J, Morales M, Caelles C. Hypoglycemic action of thiazolidinediones/ peroxisome proliferator-activated receptor gamma by inhibition of the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Diabetes* 2007; 56: 1865-1871
- 40 Bennett BL, Satoh Y, Lewis AJ. JNK: a new therapeutic target for diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 420-425
- 41 Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Ichijo H, Yamasaki Y, Hori M. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med* 2004; 10: 1128-1132

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志投稿方式

**本刊讯** 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版。在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/submission@wjgnet.com>, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助。投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d。来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。(常务副总编辑: 张海宁 2009-03-18)

# 红景天甙对肝纤维化大鼠肝组织ROCK表达的影响

吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 秦建平, 徐辉, 王钊

吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 秦建平, 徐辉, 王钊, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083

吴晓玲, 博士, 副主任医师, 主要从事肝纤维化的基础与临床研究. 四川省科技厅应用基础研究科研基金资助项目, No. 05JY029-015

作者贡献分布: 吴晓玲与曾维政对此文所作贡献均等; 此课题由曾维政设计; 研究过程由吴晓玲及秦建平操作完成; 研究所用试剂由蒋明德提供; 数据分析由徐辉与王钊完成; 本文写作由吴晓玲完成.

通讯作者: 曾维政, 610083, 四川省成都市蓉都大道天回路270号, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科.

zengweizheng@163.com

电话: 028-86570347

收稿日期: 2009-01-20 修回日期: 2009-02-19

接受日期: 2009-02-23 在线出版日期: 2009-03-18

## Effects of salidroside on expression of ROCK in rats with liver fibrosis

Xiao-Ling Wu, Wei-Zheng Zeng, Ming-De Jiang, Jian-Ping Qin, Hui Xu, Zhao Wang

Xiao-Ling Wu, Wei-Zheng Zeng, Ming-De Jiang, Jian-Ping Qin, Hui Xu, Zhao Wang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China  
Supported by: the Applied Basic Research of Sichuan Science and Technology Bureau, No. 05JY029-015

Correspondence to: Professor Wei-Zheng Zeng, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. zengweizheng@163.com

Received: 2009-01-20 Revised: 2009-02-19

Accepted: 2009-02-23 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To observe the effects of salidroside on the expression of ROCK in liver tissue of CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats, and to explore its probable mechanism.

**METHODS:** Ninety healthy SD rats were randomly divided into 3 groups: control group ( $n = 10$ ), salidroside group ( $n = 40$ ) and liver fibrosis group ( $n = 40$ ). Experimental liver fibrosis was induced by (with the concentration of 300 mL/L soluted in liquid paraffin) subcutaneous injection of CCl<sub>4</sub> (at the dosage of 3 mL/kg, twice per wk, 8 wks). The salidroside was injected into the peritoneal cavity at the dosage of 5 mg/kg, twice per week for 8 weeks. Liver tissues from each group were stained with Masson and HE

staining to observe the collagen deposition. Expressions of ROCK I and ROCK II in the liver tissue were detected with *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IH) respectively. All the figures were scanned with electronic computer, and the data were analyzed with Image-Plus software.

**RESULTS:** A significant collagen deposition and rearrangement of the parenchyma were noted in liver tissue of CCl<sub>4</sub>-treated rats. There were lots of pseudolobule in liver tissue. The semi-quantitative histological scores and average area of collagen were significantly increased when compared with control rats ( $2.1 \pm 0.3$  vs  $3.6 \pm 0.8$ ,  $74.82 \pm 21.51 \mu\text{m}^2$  vs  $290.86 \pm 89.37 \mu\text{m}^2$ , both  $P < 0.05$ ). Compared with control group, the expressions of ROCK I, ROCK II and ROCK I mRNA, ROCK II mRNA were decreased significantly in salidroside group ( $0.203 \pm 0.068$  vs  $0.357 \pm 0.182$ ,  $0.237 \pm 0.056$  vs  $0.394 \pm 0.238$ ;  $0.197 \pm 0.019$  vs  $0.394 \pm 0.238$ ,  $0.185 \pm 0.031$  vs  $0.279 \pm 0.112$ ,  $P < 0.05$  or  $0.01$ ).

**CONCLUSION:** The expressions of ROCK I and ROCK II in liver tissues are inhibited significantly with salidroside treatment. Salidroside could interfere with the signal transduction of Rho-ROCK pathway and then inhibit liver fibrosis in rats.

**Key Words:** Salidroside; Liver fibrosis; Rho associated coiled coil forming protein kinase; Liver; Rat; *In situ* hybridization

Wu XL, Zeng WZ, Jiang MD, Qin JP, Xu H, Wang Z. Effects of salidroside on expression of ROCK in rats with liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 765-769

## 摘要

**目的:** 研究红景天甙对肝纤维化大鼠肝组织ROCK基因表达的影响, 了解其干预肝纤维化的机制.

**方法:** 健康雄性SD大鼠, 随机分为3组: 对照组( $n = 10$ ), 红景天甙干预组( $n = 40$ )和肝纤维化模型组( $n = 40$ ). 大鼠肝纤维化采用

## ■背景资料

红景天具有抗氧化、抑制自由基形成、保护肝细胞、调节免疫等多种功效, 大量的前期实验表明红景天具有良好的干预CCl<sub>4</sub>诱导的动物肝纤维化作用.

## ■同行评议者

张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科; 石统东, 副教授, 重庆医科大学附属第二医院感染病科

## ■研发前沿

Rho-ROCK信号通路是近年研究的热点,该通路与众多器官的纤维化病变有关,干预该信号通路可能有助于控制器官纤维化。

CCl<sub>4</sub>皮下注射法(300 mL/L, 3 mL/kg, 每周2次,共8 wk)诱导。红景天干预采用腹腔注射法,剂量5 mg/kg,每周2次。肝脏胶原沉积状况采用Masson胶原染色以及HE染色观察,ROCK I、ROCK II表达水平分别采用原位杂交(*in situ* hybridization, ISH)和免疫组化(immunohistochemistry, IH)方法检测。实验图像经电子计算机扫描,数据采用专业图像分析软件统计分析。

**结果:**肝纤维化大鼠肝脏肝细胞坏死、再生明显,假小叶形成,胶原纤维沉积明显增加,肝实质结构紊乱。红景天干预组大鼠肝组织胶原沉积明显减少,组织学积分平均胶原面积降低( $2.1 \pm 0.3$  vs  $3.6 \pm 0.8$ ,  $74.82 \pm 21.51 \mu\text{m}^2$  vs  $290.86 \pm 89.37 \mu\text{m}^2$ , 均 $P < 0.05$ )。与模型组比较,红景天干预性治疗组ROCK I、II蛋白表达水平均明显下降( $0.203 \pm 0.068$  vs  $0.357 \pm 0.182$ ,  $0.237 \pm 0.056$  vs  $0.394 \pm 0.238$ , 均 $P < 0.05$ ), ROCK I、II mRNA表达水平明显下降( $0.197 \pm 0.019$  vs  $0.394 \pm 0.238$ ,  $0.185 \pm 0.031$  vs  $0.279 \pm 0.112$ , 均 $P < 0.01$ )。

**结论:**红景天可能通过调节Rho-ROCK信号传导通路,减少肝脏胶原纤维的合成与沉积,有效干预CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝纤维化。

**关键词:**红景天;肝纤维化;Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶;肝脏;大鼠;原位杂交法

吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 秦建平, 徐辉, 王钊. 红景天对肝纤维化大鼠肝组织ROCK表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 765-769

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/765.asp>

## 0 引言

肝纤维化是多种慢性肝脏疾病发展至肝硬化的必经之路,肝硬化病变不可逆,而肝纤维化则可能逆转,因此,积极地防治肝纤维化具有极为重要的临床意义,寻找切实有效的干预肝纤维化药物是目前肝病领域研究的难点和热点<sup>[1-2]</sup>。红景天具有抗氧化、抑制自由基形成、保护肝细胞、调节免疫等多种功效,大量的前期实验表明红景天具有良好的干预CCl<sub>4</sub>诱导的动物肝纤维化作用<sup>[3-5]</sup>。本实验研究红景天的主要单体成分-红景天甙对CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化大鼠肝组织Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶(rho associated coiled coil forming protein kinase, ROCK)基因表达与胶原沉积的影响,从分子水平进一步探讨红景天干预实验性大鼠肝纤维化的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂SD大鼠质量 $150 \pm 10$  g,购自华西医科大学实验动物中心;化学纯CCl<sub>4</sub>(成都联合化工试剂研究所),红景天甙(纯度99%,昆明同持医药有限公司,批号2003011016),ROCK I、II mRNA探针及原位杂交试剂盒(上海申能生物工程公司),山羊抗大鼠ROCK I、ROCK II多克隆抗体(美国Santa Cruz生物工程公司),免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程公司)。

**1.2 方法** 健康♂SD大鼠90只随机分为3组:正常对照组(C组)10只,红景天干预组(T组)40只,模型组(M组)40只,各组间暴露因素无差别。用300 mL/L CCl<sub>4</sub>石蜡油溶液,剂量3 mL/kg,每周2次sc,共8 wk诱导大鼠肝纤维化。干预组大鼠在造模的同时给予100 g/L红景天甙灭菌水溶液ip, 5 mg/kg,每周2次共8 wk,模型组在造模同时仅给与生理盐水ip,对照组予等量石蜡油sc和生理盐水ip处理。各组动物在最后一次注射后48 h处死,取肝组织以中性甲醛溶液固定、石蜡包埋,多聚赖氨酸涂布的载玻片制作5  $\mu\text{m}$ 组织切片,进行HE染色和Masson胶原染色作组织病理学检查;免疫组织化学(immunohistochemistry, IH)方法检测ROCK I、II蛋白表达水平,原位杂交法(*in situ* hybridization, ISH)检测ROCK I、II mRNA表达水平,检测步骤参考试剂说明书进行。ROCK I mRNA探针序列(5'→3'): Digoxin-GGT AAG TAT CTA CGA TTG CTA TAA TAT GTA AAT CCT(1185-1220 bp, GC% = 30.56); ROCK II mRNA探针序列(5'→3'): Digoxin-CAA TAA CTT TTA CAA CAT CAT AGT CTT CCG CTT(263-295 bp, GC% = 30.30),均以地高辛标记探针,辣根过氧化物酶搭桥, DAB显色,显微镜下观察结果。胶原纤维染色、ROCK I、II表达水平的ISH, IH检测结果均使用日本Nikon TE2000-H倒置显微镜采集图像,美国Image-Plus专业图像分析软件进行数据采集和分析。

**统计学处理** 胶原面积、IH, ISH表达结果均以mean $\pm$ SD表示,组间比较采用SPSS10.0统计软件进行t检验。

## 2 结果

**2.1 肝脏组织学变化与胶原沉积** 肝脏组织HE显示, CCl<sub>4</sub> sc使大鼠肝脏结构破坏明显,肝细胞脂肪变性、坏死,间质炎性细胞浸润,胶原纤维显著增生,组织学积分高达 $3.6 \pm 0.8$ ,红景天干预性治疗组肝脏病理损害较轻微,组织学积分

## ■相关报道

研究发现, ROCK特异性阻断剂Y-27632可有效阻止实验性肝纤维化,为干预该信号通路作为抗肝纤维化新途径提供了理论依据。

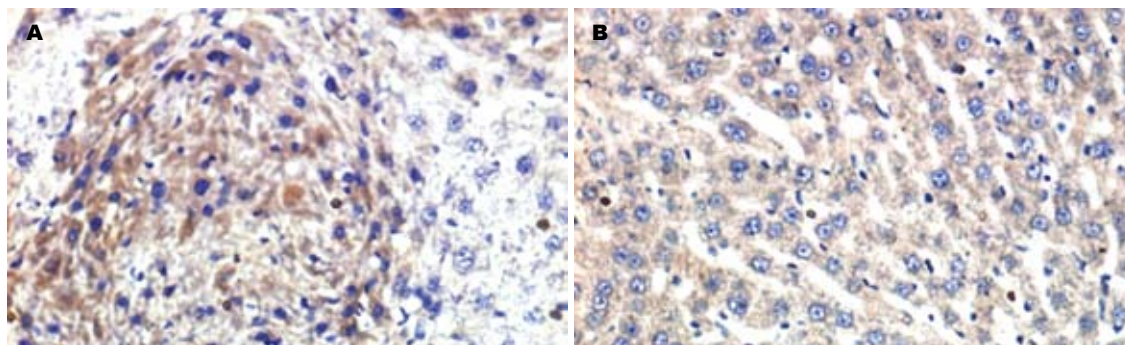


图 1 肝脏ROCK II 蛋白表达(IH × 200). A: 模型组; B: 红景天甙干预组.

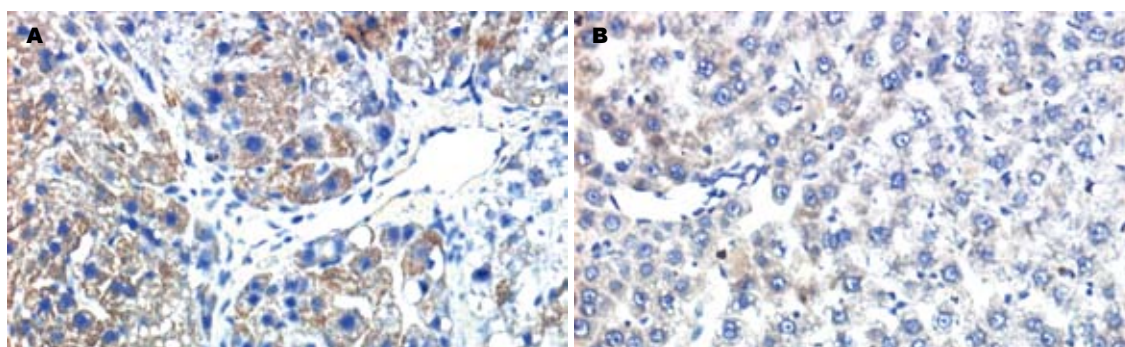


图 2 肝脏ROCK I mRNA表达(ISH × 200). A: 模型组; B: 红景天甙干预组.

2.1 ± 0.3. 胶原染色结果显示, 正常肝组织仅于中央静脉周围显示少量蓝色纤维, 为中央静脉的结缔组织着色, 肝细胞索显示为橘红色, 显色对比鲜明, 计算胶原面积仅为56.12 ± 21.45 μm<sup>2</sup>; CCl<sub>4</sub> sc使大鼠肝脏胶原沉积量显著增加, 染成蓝色的胶原纤维间隔粗大, 胶原面积增加至290.86 ± 89.37 μm<sup>2</sup>, 与正常大鼠比较差异非常显著 ( $P < 0.01$ ); 红景天甙干预组大鼠肝脏胶原面积减少为74.82 ± 21.51 μm<sup>2</sup>, ( $P < 0.05$  vs 模型组), 表明红景天甙干预性治疗能够使大鼠肝脏胶原沉积减少, 肝纤维化明显减轻(表1).

2.2 肝组织ROCK I、ROCK II 蛋白表达 免疫组化检测显示, ROCK I、ROCK II在正常大鼠肝脏仅有少许间质细胞显示微弱阳性结果, CCl<sub>4</sub> sc使大鼠肝脏ROCK I、II表达明显增加, 间质细胞和肝细胞均有表达, 计算机图像分析其A值为0.62 ± 0.23, 而红景天甙干预性治疗使大鼠肝组织ROCK I、II表达A值下降为0.18 ± 0.03, 与模型组比较差异显著 ( $P = 0.026$ ,  $P < 0.05$ , 表2, 图1).

2.3 肝组织ROCK I、ROCK II mRNA表达 原位杂交检测表明, 空白对照组大鼠肝脏ROCK I、ROCK II mRNA表达水平低下, 显色信号微弱; CCl<sub>4</sub> sc使大鼠肝脏ROCK I、ROCK II mRNA表达明显增加, A值分别为0.327 ± 0.216, 0.279

表 1 肝脏组织学积分及胶原面积

分组	组织学积分	胶原面积(μm <sup>2</sup> )
对照组	0 <sup>b</sup>	56.12 ± 21.45 <sup>b</sup>
模型组	3.6 ± 0.8	290.86 ± 89.37
干预组	2.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	74.82 ± 21.51 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 模型组.

± 0.112, 棕黄色的阳性颗粒主要定位于肝实质细胞和间质细胞的胞质, 且着色深、表达强度高; 红景天甙干预性治疗使ROCK I、ROCK II mRNA表达水平明显下降, 计算机图像分析其A值分别为0.197 ± 0.019, 0.185 ± 0.031 ( $P = 0.00012$ ,  $P < 0.01$ , 表2, 图2).

### 3 讨论

Rho-ROCK信号通路的关键分子包括Rho、GTP酶、ROCK和肌球蛋白磷酸酶. Rho属于小G蛋白家族, 有RhoA、RhoB、RhoC、RhoE等成员, 与G蛋白一样类似分子按钮在GTP结合(活化)状态与GDP结合(失活)状态之间转换, 触发下游激酶的级联反应而发挥生物学效应. ROCK属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是Rho-ROCK信号通路下游的靶效应分子, 可接受Rho分子传递的活化

#### ■创新盘点

本文章是红景天甙干预实验性肝纤维化系列研究的一部分, 其创新之处在于首先采用红景天甙制剂作为干预肝纤维化的新药物, 且从Rho-ROCK信号通路这一新视角观察其效果, 从而更深入探索红景天甙制剂干预肝纤维化的分子机制.



## ■应用要点

红景天制剂干预肝纤维化的研究取得了初步可喜的实验结果,将来有望开发红景天制剂作为抗肝纤维化的新药物,具有实际临床应用价值及开发前景。

表 2 ROCK I、II 蛋白及其mRNA表达4值

分组	ROCK I	ROCK II	ROCK I mRNA	ROCK II mRNA
对照组	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
模型组	0.357 ± 0.182	0.394 ± 0.238	0.327 ± 0.216	0.279 ± 0.112
干预组	0.203 ± 0.068 <sup>a</sup>	0.237 ± 0.056 <sup>a</sup>	0.197 ± 0.019 <sup>a</sup>	0.185 ± 0.031 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 模型组。

信号,发生多个氨基酸位点磷酸化而激活,并介导下游分子的磷酸化/脱磷酸化反应,参与平滑肌运动、胶原纤维合成等生物效应,与哮喘、高血压、动脉硬化、肿瘤浸润与转移以及多种器官纤维化等疾病密切相关<sup>[1-9]</sup>。研究发现,特异性ROCK阻断剂Y-27632能够明显抑制肝星状细胞活化,具有抗大鼠肝纤维化作用<sup>[10-20]</sup>。对Rho-ROCK信号通路及其关键分子表达状况的深入研究不仅有助于进一步阐明肝纤维化发病的分子机制,也为肝纤维化的防治研究提供了一个新的途径<sup>[21-25]</sup>。

红景天具有抗氧化、抑制自由基形成等功效,在抗缺氧、抗疲劳、调节免疫、抗缺血等方面广为应用。前期的研究证实,红景天能保护肝细胞、减少肝脏胶原合成,有效地抑制CCl<sub>4</sub>诱导的实验性大鼠肝纤维化<sup>[26-27]</sup>。红景天甙是红景天的主要活性成分,细胞实验显示红景天甙能够抑制肝星状细胞增殖、活化,减少其合成胶原。我们以红景天甙溶液腹腔注射干预大鼠肝纤维化,研究红景天甙干预作用下ROCK I、ROCK II的表达状况,初步探讨红景天甙对肝纤维化大鼠Rho-ROCK信号通路的干预作用,结果表明红景天甙能有效抑制CCl<sub>4</sub>诱导的大鼠肝组织损害和肝脏胶原沉积,大鼠肝脏胶原平均面积由691 μm<sup>2</sup>减少为138 μm<sup>2</sup>(*P*<0.01); ROCK I 蛋白表达A值由62下降为18(*P*<0.05), ROCK II 蛋白表达平均光密度值由0.235下降为0.092(*P*<0.01);同时, ROCK I mRNA表达A值则由2.86%下降为4.27%(*P*<0.05), ROCK II mRNA表达A值则由2.86上升为4.27(*P*<0.05),表明红景天甙干预性治疗能够有效抑制Rho-ROCK信号转导通路中关键的效应分子ROCK I、ROCK II的基因表达,减弱Rho-ROCK信号通路介导的肝纤维化信号向细胞内传递及下游靶基因的表达,该信号转导通路的分子传导细节以及红景天甙对其作用的分子机制有待进一步研究阐明。相信随着肝纤维化分子机制的深入研究,人类

有望最终攻克肝硬化难题<sup>[28-30]</sup>。

## 4 参考文献

- 1 楚玉峰,陈闻东,朱鼎良,高平进. RhoA/ROCK通路参与血管紧张素 II 诱导的血管外膜成纤维细胞表型转化. 中华高血压杂志 2007; 15: 394-397
- 2 胡宜. 分子开关Rho-ROCK系. 日本医学介绍 2007; 28: 44
- 3 孙骅,陈荣华. 小G蛋白Rho/Rock信号转导通路疾病. 国外医学·儿科学分册 2004; 31: 261-263
- 4 官丽丽,方莲花,杜冠华. 心血管疾病治疗的新靶点-Rho激酶. 中国药理学杂志 2008; 43: 1-4
- 5 徐亚吉,冯志强. 肾小管上皮细胞转分化的信号转导途径. 泸州医学院学报 2008; 31: 98-100
- 6 陆莉芳,胡济安. RhoC蛋白与涎腺肿瘤的关系. 国际口腔医学杂志 2008; 35: 179-182
- 7 李宁,唐劲天,李丽娟,张晓波,王晓文,姚海涛. Rho激酶对结直肠癌细胞体外侵袭转移作用的研究. 现代生物医学进展 2008; 8: 1302-1304
- 8 孙广萍,张锦,刘东,李德天. Rho激酶和转化生长因子β通路在醛固酮/盐诱导的单肾切除SD大鼠肾脏损伤中的作用. 中国现代医学杂志 2008; 18: 1388-1394
- 9 孙俊萍,张娟,宋兆峰,李晓星,季晓平. Rho激酶在乳鼠心肌细胞模拟缺血再灌注损伤细胞凋亡中的作用. 山东大学学报(医学版) 2008; 46: 498-502
- 10 Wettschureck N, Offermanns S. Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med* 2002; 80: 629-638
- 11 Kitamura K, Tada S, Nakamoto N, Toda K, Horikawa H, Kurita S, Tsunematsu S, Kumagai N, Ishii H, Saito H, Hibi T. Rho/Rho kinase is a key enzyme system involved in the angiotensin II signaling pathway of liver fibrosis and steatosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 2022-2033
- 12 Hennenberg M, Trebicka J, Biecker E, Schepke M, Sauerbruch T, Heller J. Vascular dysfunction in human and rat cirrhosis: role of receptor-desensitizing and calcium-sensitizing proteins. *Hepatology* 2007; 45: 495-506
- 13 Hennenberg M, Biecker E, Trebicka J, Jochem K, Zhou Q, Schmidt M, Jakobs KH, Sauerbruch T, Heller J. Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 2006; 130: 838-854
- 14 Zhou Q, Hennenberg M, Trebicka J, Jochem K, Leifeld L, Biecker E, Sauerbruch T, Heller J. Intrahepatic upregulation of RhoA and Rho-kinase signalling contributes to increased hepatic vascular resistance in rats with secondary biliary cirrhosis. *Gut* 2006; 55: 1296-1305
- 15 Kanno K, Tazuma S, Nishioka T, Hyogo H, Chayama K. Angiotensin II participates in hepatic inflammation and fibrosis through MCP-1

- expression. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 942-948
- 16 Murata T, Arii S, Mori A, Imamura M. Therapeutic significance of Y-27632, a Rho-kinase inhibitor, on the established liver fibrosis. *J Surg Res* 2003; 114: 64-71
- 17 Murata T, Arii S, Nakamura T, Mori A, Kaido T, Furuyama H, Furumoto K, Nakao T, Isobe N, Imamura M. Inhibitory effect of Y-27632, a ROCK inhibitor, on progression of rat liver fibrosis in association with inactivation of hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2001; 35: 474-481
- 18 Tada S, Iwamoto H, Nakamura M, Sugimoto R, Enjoji M, Nakashima Y, Nawata H. A selective ROCK inhibitor, Y27632, prevents dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *J Hepatol* 2001; 34: 529-536
- 19 Kawada N, Seki S, Kuroki T, Kaneda K. ROCK inhibitor Y-27632 attenuates stellate cell contraction and portal pressure increase induced by endothelin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 296-300
- 20 Zhang AL, Yang Z, Xiao L, Li DJ, Niu LW. [Regulatory effects of RhoGTPase on transition of liver sinusoidal capillarization: experiment with mice of schistosomal hepatic fibrosis] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2007; 87: 1564-1569
- 21 李想, 左国庆. Rho/rock信号通路参与肝纤维化形成机制的研究进展. *重庆医学* 2007; 36: 2576-2578
- 22 王玉珍, 姜慧卿, 扈彩霞, 陈新. 法舒地尔通过Rho/ROCK信号通路抑制肝星状细胞黏附、迁移和增殖. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 821-823
- 23 苏明, 万钧, 黄志强, 周宁新, 吴德斌, 范上达. 肝星状细胞的激活和Rho-ROCK信号通路在纤维化大鼠小肝移植中的作用. *中华实验外科杂志* 2005; 22: 1452-1455
- 24 张小兰, 李旭, 肖冰, 黄茂梁, 孟莹, 李鹰飞, 王媛媛, 宋卫兵. 血管紧张素 II 对大鼠肝星状细胞收缩及Rho-Rock通路的影响. *南方医科大学学报* 2008; 28: 968-971
- 25 张小兰, 肖冰, 李旭. 肝星状细胞收缩机制的研究进展. *现代消化及介入诊疗* 2008; 13: 151-154
- 26 刘东璞, 卢凤美, 张春斌. 复方红景天对大鼠肝纤维化肝脏中TIMP-1表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 3543-3546
- 27 曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 王丕龙, 褚桂珍. 红景天对肝纤维化大鼠肝组织CBP、Smad基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 341-345
- 28 何益, 熊伍军. Wnt4/Frizzled2在肝纤维化组织中的表达及其意义. *肝脏* 2008; 13: 711-713
- 29 刘娜, 张晓岚. 肝纤维化的基因治疗. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 284-288
- 30 吴晓玲, 曾维政, 蒋明德, 秦建平, 徐辉. 肝纤维化大鼠肝组织Smads基因表达状况及意义. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1037-1041

## ■同行评价

本研究内容新颖, 对中医药在肝纤维化治疗方面有一定的科学意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## ●消息●

## 世界华人消化杂志英文摘要要求

**本刊讯** 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1) 题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2) 作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3) 单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4) 基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5) 通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6) 收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2009-03-18)

# 细胞外信号调节激酶与胶原在肝纤维化过程中的表达及相关性

强 晖, 徐红娟, 周国雄, 黄介飞, 黄 华, 张 弘

## ■背景资料

肝纤维化是慢性肝病共有的、重要的病理特征,也是进一步向肝硬化发展的主要中间环节,属可逆性病变。目前对肝硬化无有效的治疗手段,因此阐明肝纤维化发生机制具有重要的临床意义。

强晖, 徐红娟, 周国雄, 黄介飞, 黄华, 张弘, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001

强晖, 2003年上海第二军医大学博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事消化系统疾病的诊治研究。

作者贡献分布: 本课题由强晖, 周国雄及黄介飞设计; 研究过程由强晖, 徐红娟, 黄华及张弘操作完成; 数据分析由强晖, 徐红娟, 及黄华完成; 论文写作由强晖, 徐红娟及黄介飞完成。

通讯作者: 强晖, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科。 qianghui@medmail.com.cn

电话: 0513-85052078

收稿日期: 2009-02-01 修回日期: 2009-02-21

接受日期: 2009-02-23 在线出版日期: 2009-03-18

## Expression of extracellular signal-regulated kinase in hepatic fibrosis and its correlation with collagen type I and III

Hui Qiang, Hong-Juan Xu, Guo-Xiong Zhou, Jie-Fei Huang, Hua Huang, Hong Zhang

Hui Qiang, Hong-Juan Xu, Guo-Xiong Zhou, Jie-Fei Huang, Hua Huang, Hong Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Dr. Hui Qiang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. qianghui@medmail.com.cn

Received: 2009-02-01 Revised: 2009-02-21

Accepted: 2009-02-23 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of ERK during the development of hepatic fibrosis and the correlation of ERK and I, III collagens.

**METHODS:** Hepatic fibrosis was induced by subcutaneous injection of DMN. Rats were killed for study at the end of first, second, third weeks and the clinical operative liver samples were collected. The development expression and location of the ERK in the hepatic tissue and the correlation of ERK with collagen I, III were assessed by means of immunohistochemistry.

**RESULTS:** The expression of ERK was increased and was closely correlated with that of collagen

I and III during the development of rat fibrosis at every time point (1 wk:  $r = 0.75, 0.68, P < 0.05$ ; 2 wk:  $r = 0.82, 0.78, P < 0.05$ ; 3 wk:  $r = 0.74, 0.83, P < 0.05$ ). Similarly, the expression of ERK was enhanced in human fibrotic tissues ( $1.068 \pm 0.258$  vs  $0.035 \pm 0.011, P < 0.05$ ), which was correlated with that of collagen I and III ( $r = 0.87, 0.88, \text{all } P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The ERK signal pathway may play an important role in the pathogenesis of hepatic fibrosis.

**Key Words:** Extracellular signal-regulated kinase; Hepatic fibrosis; Extracellular matrix

Qiang H, Xu HJ, Zhou GX, Huang JF, Huang H, Zhang H. Expression of extracellular signal-regulated kinase in hepatic fibrosis and the correlation of ERK with collagen type I and III. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 770-774

## 摘要

**目的:** 观察细胞外信号调节激酶(ERK)在肝纤维化组织中的表达变化及其与 I、III 型胶原表达的相关性,并探讨其在肝纤维化发生中的作用。

**方法:** 二甲基亚硝胺(DMN)诱导大鼠肝纤维化,于用药1、2、3 wk分别取肝组织;收集临床肝手术标本,包括纤维化肝组织和远癌的纤维化肝组织,以正常肝组织做对照。采用免疫组化法检测ERK在肝纤维化组织中表达和定位及其与 I、III 型胶原表达的相关性。

**结果:** 随着大鼠注射DMN时间的延长,ERK、I、III 型胶原的表达逐渐增加,且在各时间组肝组织中ERK的表达与 I、III 型胶原的表达呈正相关(1 wk:  $r = 0.75, 0.68, P < 0.05$ ; 2 wk:  $r = 0.82, 0.78, P < 0.05$ ; 3 wk:  $r = 0.74, 0.83, P < 0.05$ )。同样,ERK在人肝纤维化组较对照组表达增加( $1.068 \pm 0.258$  vs  $0.035 \pm 0.011, P < 0.05$ ),且ERK的表达与 I、III 型胶原的表达正相关( $r = 0.87, 0.88, \text{均 } P < 0.05$ )。

## ■同行评议者

陈红松, 研究员, 北京大学人民医院肝病研究所; 高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

**结论:** ERK可能与肝纤维化的发生机制及胶原合成密切相关。

**关键词:** 细胞外信号调节激酶; 肝纤维化; 细胞外基质

强晖, 徐红娟, 周国雄, 黄介飞, 黄华, 张弘. 细胞外信号调节激酶与胶原在肝纤维化过程中的表达及相关性. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 770-774

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/770.asp>

## 0 引言

细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路中的重要成员, 主要被生长因子、多肽类激素以及神经递质激活, 控制着细胞增殖、分化、生存和凋亡<sup>[1-2]</sup>. ERK在人肝纤维化组织中的表达研究国内外尚未见报道. 本实验旨在验证ERK分别在大鼠和人纤维化肝组织中的蛋白水平表达以及其与I、III型胶原表达的相关性, 探讨ERK信号通路在肝纤维化发生中的作用, 进一步阐明肝纤维化的发生机制, 为研究其他的MAPK信号通路相关基因以及肝纤维化的防治打下基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** ♂ Sprague-Dawley(SD)大鼠36只, 体重200-250 g, 清洁级, 购于中国科学院上海实验动物中心.

### 1.2 方法

**1.2.1 造模:** 分为二甲基亚硝胺(DMN)造模组( $n=18$ )、对照组( $n=18$ ), 将造模组皮下注射10 mg/kg体质量的DMN生理盐水溶液, 对照组皮下注射等体积生理盐水, 每周连续3 d, 共3 wk, 分别于DMN注射后的1、2、3 wk末取肝组织(处死大鼠时距末次注射的时间为72 h). 肝组织经100 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 4-5  $\mu\text{m}$ 厚度连续切片后, 进一步行HE及VG染色明确病理改变.

**1.2.2 组织标本收集:** 收集2005-10/2006-10南通大学附属医院手术住院治疗的25例肝组织标本, 其中10例非纤维化肝组织(包括正常肝组织和炎症性肝组织), 15例纤维化肝组织(包括单纯肝纤维化和癌旁肝纤维化组织). 所有的病例均经组织病理证实.

**1.2.3 免疫组化检测ERK与I、III型胶原在纤维化肝组织中的表达:** 参照武汉博士德生物工程

有限公司SABC试剂盒使用说明书. 一抗工作浓度: 兔抗大鼠ERK1/2抗体及磷酸化RK1/2抗体(美国Cell Signal 公司)1:500, 兔抗大鼠I、III型胶原抗体(武汉博士德公司)1:200.

**统计学处理** 根据阳性染色范围, 将免疫组化切片用图象分析仪进行半定量分析, 每张切片随机扫描10个视野, 取其吸光度平均值. 使用SPSS10.0软件进行统计分析,  $P<0.05$ 具有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 大鼠实验性肝纤维化模型建立** 造模组大鼠体重明显下降, 并有死亡. 造模组1、2 wk末各处死6只, 3 wk末处死5只, 对照组大鼠各周均处死6只. 肝组织HE和VG染色显示模型组大鼠肝组织出现明显的肝细胞气球样变性、坏死及炎性细胞浸润; 随着DMN注射时间的延长, 逐渐出现汇管区扩大, 汇管区胶原纤维沉积, 纤维结缔组织增生明显并自汇管区呈放射状扩展, 向小叶周围延伸; 部分中央静脉区纤维结缔组织沉积增多.

**2.2 人肝组织病理学改变** HE染色显示正常肝组织结构规整, 可见肝细胞索围绕中央静脉呈放射状分布形成正常的肝小叶结构; 纤维化肝组织炎性细胞浸润, 汇管区扩大, 汇管区胶原纤维沉积, 并自汇管区呈放射状向小叶周围扩展、延伸.

**2.3 免疫组化结果分析** 正常大鼠肝脏组织ERK染色弱阳性, 主要分布于肝血窦壁间质细胞中, 胞质和胞核内均有着色(图1A), 注射DMN 2 wk后ERK染色明显增强且以核内明显, 并分布在汇管区及纤维间隔中(图1B). 同样, 正常肝脏I、III型胶原主要分布于汇管区(图1C, E), 注射DMN 1 wk时, I、III型胶原进一步在肝血窦周围延伸, 阳性反应较前增强, 随着注射时间的延长, 在注射DMN 3 wk时I、III型胶原的阳性反应明显增强, 并沿着细胞呈树枝状分布(图1D, F). **2.4 免疫组化的半定量分析及相关性比较** 将免疫组化结果行半定量分析后发现, 随着DMN注射时间的延长, ERK、I型、III型胶原的表达逐渐增加, 且在各时间组ERK1与I型、III型胶原的相关均有显著性( $P<0.05$ ), 在第1周时与I型、III型胶原的相关系数分别为0.75、0.68; 第2周时与I型、III型胶原的相关系数分别为0.82、0.78; 第3周时与I型、III型胶原的相关系数分别为0.74、0.83(表1).

## ■ 研发前沿

ERK可能参与肝纤维化发病机制, 但在肝纤维化过程中的确切机制仍未明了.

## ■ 相关报道

MAPK信号传导通路是经典的有丝分裂通路, 有研究表明, ERK在胰腺星状细胞(类似HSC)激活中起核心作用, 抑制ERK信号传导可能成为防止胰腺星状细胞激活的重要途径. 还有报道IGF-1促进HSC增殖及I型胶原聚积时依赖于磷脂酰肌醇3激酶(PI3-K)和ERK, 因此ERK可能参与肝纤维化发病机制.



### ■创新盘点

ERK是有丝分裂信号通路的重要成员,主要被生长因子等有丝分裂原激活,并与细胞增生、分化有关。本研究首次应用免疫组化技术研究ERK在人肝纤维化组织中表达,为进一步研究MAPK信号传导通路相关基因在肝纤维化中的作用打下基础。

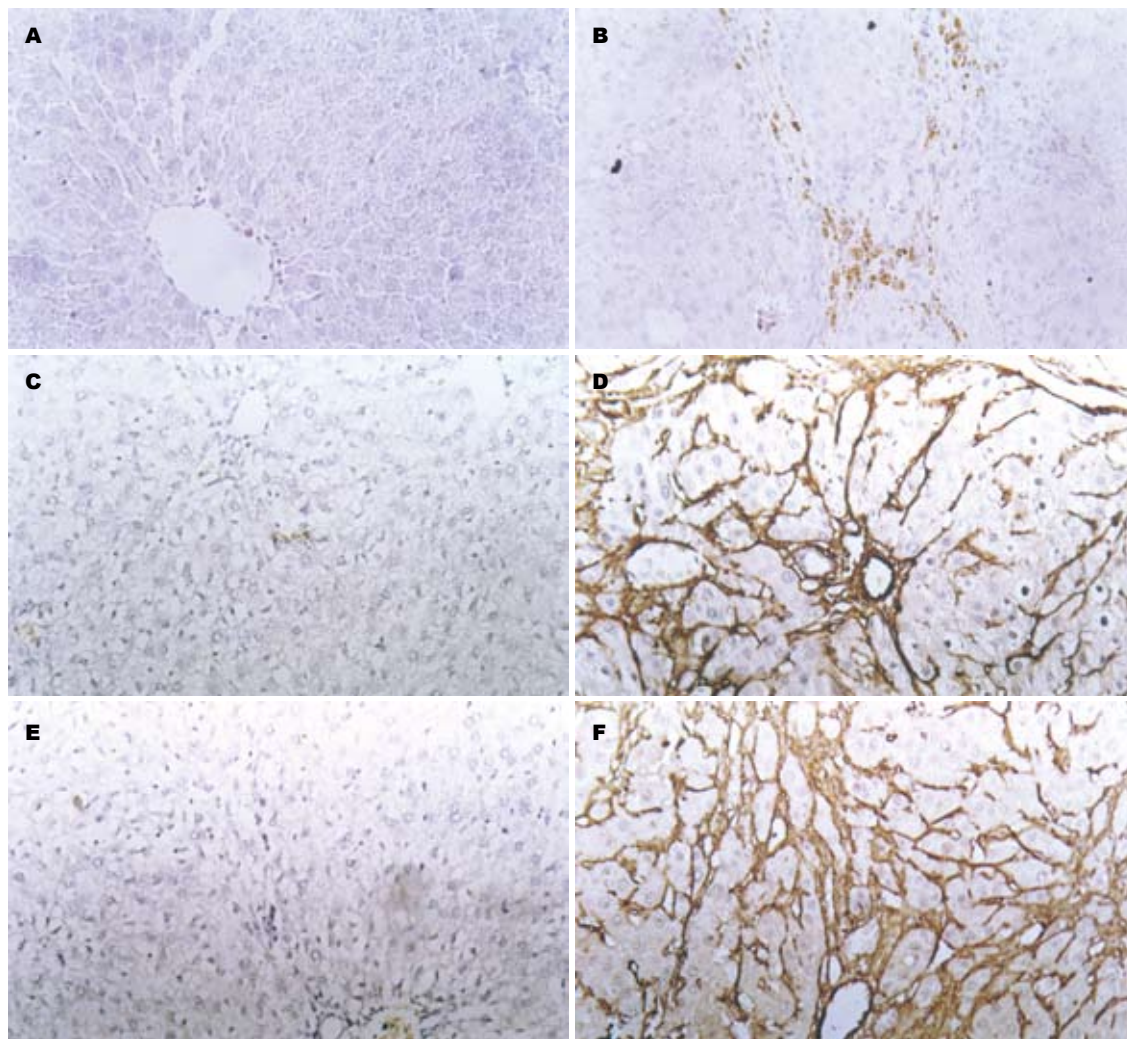


图1 大鼠肝组织中ERK及I、III型胶原的表达(DAB显色×200)。A、C、E: 对照组; B、D、F: 纤维化组; A-B: ERK; C-D: I型胶原; E-F: III型胶原。

表1 大鼠肝组织中ERK及I、III型胶原免疫组化的半定量值(mean±SD)

分组	ERK	I型胶原	III型胶原
对照组	0.130±0.032	0.056±0.012	0.046±0.041
DMN 1 wk组	0.367±0.053 <sup>a</sup>	0.303±0.071 <sup>a</sup>	0.422±0.044 <sup>a</sup>
DMN 2 wk组	0.764±0.047 <sup>c</sup>	0.714±0.064 <sup>c</sup>	0.642±0.085 <sup>a</sup>
DMN 3 wk组	0.821±0.108 <sup>a</sup>	0.963±0.076 <sup>a</sup>	0.843±0.102 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 对照组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs DMN 1 wk组。

同样,在人纤维化肝组织中,ERK的表达明显增加,I、III型胶原的表达也相应增加,纤维化肝组织中ERK与I、III型胶原的相关系数分别为0.865、0.884, ( $P<0.05$ ),具有统计学意义(表2)。

### 3 讨论

肝纤维化是各种致病因子反复损伤肝脏,引起慢性肝病后共同的转归途径,最终导致肝硬化,成为严重威胁人类健康的常见病、多发病。

肝纤维化形成的基础是ECM(包括胶原、糖蛋白、多聚糖胺等)合成和降解的失衡<sup>[3-4]</sup>。目前对肝硬化尚缺乏有效的治疗手段,因此对肝纤维化的研究成了近20年世界医学攻关的一个热点。但迄今为止肝纤维化发生的确切机制尚未明确,阐明肝纤维化发生机制并寻求有效的治疗方法具有重要临床意义。

MAPK信号传导通路是经典的有丝分裂通路,是真核细胞对许多不同刺激翻译和反应

表 2 人肝组织中ERK及 I、III 型胶原免疫组化的半定量值 (mean  $\pm$  SD)

分组	n	ERK	I 型胶原	III 型胶原
非纤维化组	10	0.035 $\pm$ 0.011	0.039 $\pm$ 0.015	0.034 $\pm$ 0.014
纤维化组	15	1.068 $\pm$ 0.258 <sup>a</sup>	1.076 $\pm$ 0.274 <sup>a</sup>	0.996 $\pm$ 0.282 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 非纤维化组.

的信号介导和信号网络的枢纽, 控制着细胞增殖、分化、生存和凋亡, 是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者, 他们介导胞质到胞核的信号传导<sup>[5-6]</sup>. 近期的研究表明, MAPK 信号通路与人多种脏器纤维化的发生密切相关<sup>[7-9]</sup>. 在哺乳动物细胞, MAPK家族的ERK亚族已得到比较详细的研究. ERK是有丝分裂信号通路的重要成员, 主要被生长因子等有丝分裂原激活, 并与细胞增生、分化有关. 细胞周期蛋白D1的转录需要ERK的长期激活和核滞留. ERK1/2为脯氨酸导向的丝氨酸/苏氨酸激酶. 他正常定位于胞质, 当激活后转位至胞核, 调节转录因子活性, 产生细胞效应. ERK1和ERK2有85%同源性, 其蛋白分子质量分别为43 kDa和41 kDa. ERK1和ERK2在各种组织中普遍表达, 可被一对蛋白激酶MEK1和MEK2磷酸化而活化, ERK的活化是几种Ras诱导的细胞反应中关键的一步, ERK1/2通过磷酸化转化为pERK1/2而发挥信号传导的生物学功能, 活化的ERK能转移入核, 磷酸化转录因子, 从而调节他们的活性<sup>[10-11]</sup>.

目前认为, HSC的激活是肝纤维化发生的中心环节<sup>[12-13]</sup>. TGF- $\beta$ 、PDGF是激活HSC并促进其增殖的最重要细胞因子<sup>[14-15]</sup>. 在正常状态下, HSC主要储存和代谢维生素A, 合成与分泌少量的ECM及有一定产生胶原酶的能力. 在慢性肝损伤时, HSC活化后转化为成纤维样细胞, 并大量合成以胶原为主的细胞外基质积聚肝内<sup>[16-17]</sup>. Reimann *et al*<sup>[18]</sup>发现在大鼠原代培养的HSC中, TGF- $\beta$ 1可诱导Ras、Raf-1、MEK和ERK的活性, 并且ERK的活性依赖于MEK的活性. Davis *et al*<sup>[19]</sup>用原代培养的大鼠HSC阐明了Ras-Raf-1-MAPK级联在胶原基因表达中的作用, 阻断MAPK活性则胶原基因表达减少. IGF-1在炎性和纤维化的组织中表达增加, 并刺激成纤维细胞、平滑肌细胞和大鼠HSC增殖, 诱导胶原合成. Svegliati-Baroni *et al*<sup>[20]</sup>发现IGF-1促进人HSC增殖及 I 型胶原聚积时依赖于磷脂酰肌醇3激酶(PI3-K)和ERK. 最近, Jaster *et al*<sup>[21]</sup>研究认为ERK在胰腺星状细胞(类似HSC)激活中起

核心作用, 抑制ERK信号传导可能成为防止胰腺星状细胞激活的重要途径. 然而ERK在肝纤维化中的确切功能仍未阐明, 他在人肝纤维化组织中的表达研究国内外尚未见报道.

本实验采用免疫组化法检测大鼠肝纤维化发展过程中ERK与 I、III型胶原表达的动态变化, 并进一步临床研究15例人纤维化肝组织和10例非纤维化肝组织中ERK及 I、III型胶原的表达, 结果提示纤维化肝组织中ERK及 I、III型胶原的表达明显增加, 随着纤维化程度的加深, ERK表达量增加, 且与纤维化程度呈正相关. 我们的结果表明: ERK在正常和纤维化的肝组织中均有表达, 肝纤维化时, ERK的表达范围增大, 胞质和胞核内的表达增加且以核内为主, 提示肝纤维化时ERK不仅表达增多, 而且被激活并向核内转移. 由此可以推测, ERK及其介导的信号通路是通过促进HSC的活化与增殖进而参与肝纤维化的发生发展过程. MAPK信号通路与肝纤维化的发生有着密切的关系, 随着对MAPK信号通路理解的不断深入, 其在肝纤维化发生的分子机制中的作用会越来越地引起人们的关注.

#### 4 参考文献

- Li C, Scott DA, Hatch E, Tian X, Mansour SL. Dusp6 (Mkp3) is a negative feedback regulator of FGF-stimulated ERK signaling during mouse development. *Development* 2007; 134: 167-176
- Yuantai W, Tiancai W, Qiu Z. PD98059 inhibits expression of pERK1 protein and collagen alpha1(I) mRNA in rat pancreatic stellate cells activated by platelet-derived growth factor. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24: 100-103
- Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2007; 27: 413-426
- Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S79-S84
- Hirosawa M, Nakahara M, Otosaka R, Imoto A, Okazaki T, Takahashi S. The p38 pathway inhibitor SB202190 activates MEK/MAPK to stimulate the growth of leukemia cells. *Leuk Res* 2008 Nov 6. [Epub ahead of print]
- Brown MD, Sacks DB. Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell Signal* 2009; 21: 462-469
- Chopra P, Kanoje V, Semwal A, Ray A. Therapeutic

#### ■应用要点

本研究有助于进一步阐明肝纤维化发病机制和MAPK通路相关基因的初步功能, 为预防、诊断和治疗肝纤维化提供新的有效靶点.

## ■同行评价

本文新颖性强, 设计合理, 结果可靠, 具有较好的学术价值.

- potential of inhaled p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors for inflammatory pulmonary diseases. *Expert Opin Investig Drugs* 2008; 17: 1411-1425
- 8 Schwer CI, Guerrero AM, Humar M, Roesslein M, Goebel U, Stoll P, Geiger KK, Pannen BH, Hoetzel A, Schmidt R. Heme oxygenase-1 inhibits the proliferation of pancreatic stellate cells by repression of the extracellular signal-regulated kinase1/2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 327: 863-871
- 9 Qiang H, Lin Y, Zhang X, Zeng X, Shi J, Chen YX, Yang MF, Han ZG, Xie WF. Differential expression genes analyzed by cDNA array in the regulation of rat hepatic fibrogenesis. *Liver Int* 2006; 26: 1126-1137
- 10 Shatos MA, Gu J, Hodges RR, Lashkari K, Dartt DA. ERK/p44p42 mitogen-activated protein kinase mediates EGF-stimulated proliferation of conjunctival goblet cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 3351-3359
- 11 Kohda Y, Matsunaga Y, Shiota R, Satoh T, Kishi Y, Kawai Y, Gemba M. Involvement of Raf-1/MEK/ERK1/2 signaling pathway in zinc-induced injury in rat renal cortical slices. *J Toxicol Sci* 2006; 31: 207-217
- 12 Sarem M, Znaidak R, Macías M, Rey R. [Hepatic stellate cells: it's role in normal and pathological conditions] *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 93-101
- 13 Moreira RK. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131: 1728-1734
- 14 Shi YF, Zhang Q, Cheung PY, Shi L, Fong CC, Zhang Y, Tzang CH, Chan BP, Fong WF, Chun J, Kung HF, Yang M. Effects of rhDecorin on TGF-beta1 induced human hepatic stellate cells LX-2 activation. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 1587-1595
- 15 Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M, Temming K, van Loenen AM, Reker-Smit C, Meijer DK, Lacombe M, Opdam F, Kéri G, Orfi L, Poelstra K, Kok RJ. Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 321: 856-865
- 16 Priya S, Sudhakaran PR. Cell survival, activation and apoptosis of hepatic stellate cells: modulation by extracellular matrix proteins. *Hepatol Res* 2008; 38: 1221-1232
- 17 Yuhua Z, Wanhua R, Chenggang S, Jun S, Yanjun W, Chunqing Z. Disruption of connective tissue growth factor by short hairpin RNA inhibits collagen synthesis and extracellular matrix secretion in hepatic stellate cells. *Liver Int* 2008; 28: 632-639
- 18 Reimann T, Hempel U, Krautwald S, Axmann A, Scheibe R, Seidel D, Wenzel KW. Transforming growth factor-beta1 induces activation of Ras, Raf-1, MEK and MAPK in rat hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 1997; 403: 57-60
- 19 Davis BH, Chen A, Beno DW. Raf and mitogen-activated protein kinase regulate stellate cell collagen gene expression. *J Biol Chem* 1996; 271: 11039-11042
- 20 Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Di Sario A, Saccomanno S, Bendia E, Benedetti A, Greenwel P. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2001; 33: 1130-1140
- 21 Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut* 2002; 51: 579-584

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 《World Journal of Gastroenterology》(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. 《Journal of Zhejiang University Science B》(浙江大学学报B)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊. 《World Journal of Gastroenterology》(世界胃肠病学杂志)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>



# 靶向Skp2基因siRNA对大肠癌细胞生物学特性的影响

解方为, 彭永海, 张霞, 欧阳学农

解方为, 彭永海, 张霞, 欧阳学农, 中国人民解放军南京军区福州总医院肿瘤科 福建省福州市 350025

解方为, 博士, 主要从事肿瘤内科治疗方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由解方为设计; 研究过程由解方为、彭永海、张霞及欧阳学农操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由彭永海提供; 数据分析由张霞完成; 本论文写作由解方为完成。

通讯作者: 解方为, 350025, 福建省福州市, 中国人民解放军南京军区福州总医院肿瘤科. zjxfw@tom.com

电话: 0591-22859444

收稿日期: 2009-01-05 修回日期: 2009-01-19

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-18

## Influence of Skp2-targeted siRNA on characteristics of human colorectal cancer cell line

Fang-Wei Xie, Yong-Hai Peng, Xia Zhang, Xue-Nong Ouyang

Fang-Wei Xie, Yong-Hai Peng, Xia Zhang, Xue-Nong Ouyang, Department of Oncology, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Dr. Fang-Wei Xie, Department of Oncology, Fuzhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. zjxfw@tom.com

Received: 2009-01-05 Revised: 2009-01-19

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To design and construct the RNAi eukaryotic vector of Skp2 gene and to study its interfering effect on characteristics of human colorectal carcinoma cell line HCT116.

**METHODS:** DNA oligonucleotide for small interfering RNA expression targeting Skp2 gene was synthesized and inserted into pRNAT-U6.1/Neo plasmid after annealing. The inserted sequences were verified by DNA sequencing, and transfected into HCT116 cells with liposome-mediated transfection. The positive transfected cell clones were screened with G418 and the expression of Skp2 mRNA was detected by semi-quantitative RT-PCR. Distribution of cell cycle was assessed by flow cytometry. The cell growth suppression was analyzed by MTT assay.

**RESULTS:** The sequence of specific siRNA was

correct by sequence analysis. Compared with the negative control cells, RT-PCR showed the expression of Skp2 mRNA was down-regulated in the transfected cells ( $P < 0.05$ ). The subcloned recombinant plasmid expressing shRNA effectively inhibited HCT116 cell growth and proliferation while empty plasmid had no such specific effect. Decreased cellular proliferation activity was observed by MTT ( $29.21\% \pm 1.40\%$ ,  $30.10\% \pm 1.50\%$  vs  $49.05\% \pm 4.50\%$ ,  $53.03\% \pm 4.92\%$ , all  $P < 0.05$ ). Flow cytometry revealed significant  $G_1$  arrest in cell cycle.

**CONCLUSION:** The siRNA eukaryotic expression vector of Skp2 gene was constructed successfully which effectively down-regulate the expression of Skp2 in HCT116 cell line, and inhibit the cellular proliferation. It provides a powerful evidence for colorectal carcinoma gene therapy.

**Key Words:** Skp2 gene; Intestinal neoplasms; RNA interference; Gene expression

Xie FW, Peng YH, Zhang X, Ouyang XN. Influence of Skp2-targeted siRNA on characteristics of human colorectal cancer cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 775-779

## 摘要

**目的:** 设计和构建Skp2特异性的siRNA真核表达载体, 观察Skp2siRNA重组体对人大肠癌HCT116细胞株生物学特性的影响。

**方法:** 人工合成Skp2基因干扰序列并定向插入到RNAi真核表达载体pRNAT-U6.1/Neo, 通过测序鉴定。用脂质体介导的基因转染方法转入HCT116细胞, 经G418筛选出稳定转染的细胞系, 半定量RT-PCR方法检测靶基因的表达。流式细胞技术分析细胞周期分布, MTT比色法检测细胞的生长抑制率。

**结果:** 测序表明Skp2干扰序列完全正确。RT-PCR结果显示2条Skp2siRNA真核表达质粒均能有效抑制核干因子mRNA的转录表达 ( $P < 0.05$ )。MTT比色法检测显示, 与阴性对照组及未转染组细胞比较, 干扰组细胞增殖率

## ■背景资料

泛素蛋白酶体途径是真核细胞中的一种蛋白降解途径, 主要降解胞内泛素化的蛋白质。Skp2作为泛素化降解过程中的一种F-box蛋白, 在泛素化降解中起着特异性的底物识别和关键性的速率限制作用, 且具有原癌基因蛋白功能, 能促进癌细胞的细胞周期进展, 与多种恶性肿瘤的发生和发展过程密切相关。

## ■同行评议者

熊斌, 教授, 武汉大学中南医院肿瘤科



## ■创新盘点

本研究利用RNAi技术对人大肠癌HCT116细胞株的Skp2基因进行下调,并检测下调后细胞的生物学行为的改变,揭示其作用机制,为大肠癌治疗提供新的靶点及技术,国内外尚未见相关报道。

明显下降( $29.21\% \pm 1.40\%$ ,  $30.10\% \pm 1.50\%$  vs  $49.05\% \pm 4.50\%$ ,  $53.03\% \pm 4.92\%$ , 均 $P < 0.05$ )。流式细胞术检测结果显示转染后G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞数占生长周期细胞数的比例增多,即表现为G<sub>1</sub>期阻滞,S期细胞的比例降低。

**结论:** 成功构建了Skp2干扰真核表达载体, siRNA重组体能有效抑制人大肠癌细胞Skp2 mRNA表达, 细胞增殖能力减弱, 为大肠癌基因治疗的可行性提供了有力的证据。

**关键词:** Skp2基因; 肠肿瘤; RNA干扰; 基因表达

解方为, 彭永海, 张霞, 欧阳学农. 靶向Skp2基因siRNA对大肠癌细胞生物学特性的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 775-779

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/775.asp>

## 0 引言

泛素蛋白酶体途径(ubiquitin proteasome pathway)是真核细胞中的一种蛋白降解途径, 主要降解胞内泛素化的蛋白质<sup>[1]</sup>。Skp2作为泛素化降解过程中的一种F-box蛋白, 在泛素化降解中起着特异性的底物识别和关键性的速率限制作用。近年来, 在实体瘤的研究中发现Skp2具有原癌基因蛋白功能, 能促进癌细胞的细胞周期进展, 与多种恶性肿瘤的发生和发展过程密切相关<sup>[2]</sup>。RNA干扰是一种序列特异性的转录后基因沉默现象, 他由与靶基因序列同源的双链RNA所诱导<sup>[3]</sup>, 目前已被广泛应用于功能基因组和基因治疗的研究。本实验拟使用这种技术, 对人大肠癌HCT116细胞株的Skp2基因进行下调, 并检测下调后细胞的生物学行为的改变, 为大肠癌的基因治疗提供实验基础和理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人大肠癌HCT116细胞株购自中国科学院基础医学研究所细胞中心。细胞培养于含100 mL/L灭活小牛血清,  $1 \times 10^5$  U/L青霉素, 100 mg/L链霉素的1640培养液中, 于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中培养, 取对数生长期细胞用于实验。pRNAT-U6.1/Neo质粒本室保存, BamH I、HindIII限制性内切酶购自美国Promega公司, 1640培养基、标准小牛血清购自美国Hyclone公司, 阳离子脂质体试剂(Lipofectamine™2000)购自Invitrogen公司, 四氮唑蓝购于Sino-American Biotechnology公司, RT-PCR试剂盒为大连TaKaRa生物公司产品, DL2000核酸分子质量标

准、柱离心式质粒抽提试剂盒、柱离心式胶回收试剂盒均购自美国Promega公司。流式细胞仪(库尔特ESP公司, 美国), 荧光显微镜(Leica, 德国), 酶标仪(B&D公司, 美国), 2700型PCR扩增仪(Perkin Elmer, 美国), DU-640型紫外分光光度仪(Bio-Rad公司, 美国), Gel Doc 2000凝胶图像分析系统(Bio-Rad公司, 美国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 siRNA合成和真核表达载体的构建:** 根据Skp2基因序列(GenBank NM\_005983) siRNA设计规则通过www.genscript.com网站在线siRNA设计工具设计二对siRNA, 设计基因靶点分别于NS基因的第1117、877位点, 靶序列分别为: Skp2 I: TTGTCCATCTAGACTTAAGTG; Skp2 II: TAGTGCGACTTAACCTTTCTG; 另设计一对阴性对照siRNA: TTCTCCGAACGTGTCACGT, 经BLAST软件分析, 同任何基因序列均无同源性, 由上海生物工程技术有限公司合成。模板链两端分别设计BamH I和HindIII酶切位点, 对应的两段寡核苷酸分别以去离子水溶解(浓度为1 g/L), 各取5 μL加入90 μL去离子水, 煮沸5 min, 自然冷却, 寡核苷酸退火。用BamH I和HindIII双酶切pRNAT-U6.1/Neo质粒, 37℃, 3 h。对酶切产物进行琼脂糖电泳, 紫外灯下切下线性化的条带, 应用琼脂糖DNA回收试剂盒, 回收线性化载体。进行连接反应, 体系如下: 退火的寡核苷酸1 μL, 双酶切的pRNAT-U6.1/Neo 3 μL, 去离子水4 μL, 10×T4 DNA Ligase Buffer 1 μL, T4 DNA Ligase 0.33 μL, 4℃过夜。连接产物分别命名为: RNAi -1、RNAi -2和RNAi-N(阴性对照质粒)。

**1.2.2 细胞的转染及荧光显微镜观察:** 将细胞种植于24孔板, 待细胞融合率达70%时, 将0.8 μg干扰质粒和2 μL Lipofectamine™2000分别加至50 μL无血清1640中, 轻微震荡摇匀, 5 min后将两者混匀, 室温放置25 min后, 将其加入无血清HCT116细胞, 边加边轻轻混合, 转染细胞培养液总体积为500 μL。将转染后的细胞置37℃孵箱孵育6 h后, 弃去转染液, 加入含100 mL/L胎牛血清的1640培养基继续培养, 转染24 h后将转染的细胞按1:10稀释, 将其种植于另一培养板, 再经过24 h后, 向培养液中加入600 mg/L的G418进行抗性筛选, 14 d后荧光显微镜下可见细胞克隆发出荧光, 对阳性克隆进行有限稀释, 扩大培养后获得稳定表达的细胞株。

**1.2.3 RT-PCR检测Skp2 mRNA表达水平:** 提取

表 1 各基因的引物序列

基因	序列	大小 (bp)	退火 温度(°C)
$\beta$ -actin			
正义	GTTGCGTTACACCCCTTCTTGACA	446	58
反义	GCACGAAGGCTCATTCATCAAAA		
Skp2			
正义	AATTGCTCCCATTTCACCAC	221	60
反义	ATGAAGGCAAAGGGAAAACC		

细胞总RNA行RT-PCR检测, 按TRIzol的操作说明提取总RNA, 各取1  $\mu$ g, 按反转录试剂盒操作方法获得单链cDNA, 以此为底物用PCR检测NS的表达, PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, BioRad 2000凝胶成像仪采集图像, 以Quantity one软件进行分析, 测定各条带的吸光度值, 以目的基因吸光度值与对应样品内参基因吸光度值的比值作为该样品中目的基因的相对转录量, 最后以目的基因的相对转录量为参数进行统计分析. Skp2 mRNA表达抑制率(%)的计算方法为 $(1 - \text{RNAi组Skp2 mRNA} / \text{RNAi-N组Skp2 mRNA}) \times 100\%$ . PCR条件为: 94°C预变性3 min, 94°C变性30 s; 58°C(Skp2为58°C,  $\beta$ -actin为60°C)退火30 s, 72°C延伸1 min, 30个循环: 72°C 8 min, 4°C孵育. PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳, BioRad 2000凝胶成像仪采集图像. 各基因的引物序列见表1.

1.2.4 MTT法检测细胞生长曲线: 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法, 将转染后的干扰组、阴性对照组细胞和未转染组分别接种于6块96孔板, 接种密度为 $1 \times 10^4$ /孔, 每天取1板进行MTT反应, 测定490 nm吸光度值, 取平均值. 连续测定6 d, 绘制细胞生长曲线, 比较干扰组细胞与阴性对照组细胞和未转染组的生长增殖.

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期: 收集转染后扩增的干扰组细胞、阴性对照组细胞和未转染组各 $1 \times 10^6$ 个, 700 mL/L冰乙醇固定, 碘化丙啶(PI)染色, 上流式细胞仪测定细胞周期情况.

**统计学处理** 应用SPSS10.0统计软件包, 计量资料采用mean  $\pm$  SD表示, 组间比较单因素方差Dunnett test分析,  $P < 0.05$ 为统计学有差异.

## 2 结果

2.1 重组siRNA真核表达载体的测序及转染细胞的荧光显微镜观察 通过大连宝生物测序结果表明, 所获得的重组干扰质粒目的片段与预期完

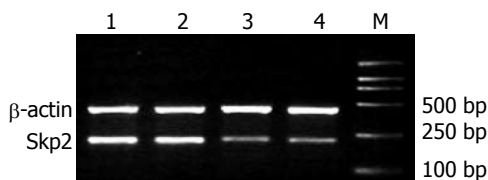


图 1 重组质粒转染对Skp2mRNA表达的影响. M: DNA标准; 1: 未转染组; 2: RNAi-N; 3: RNAi-1; 4: RNAi-2.

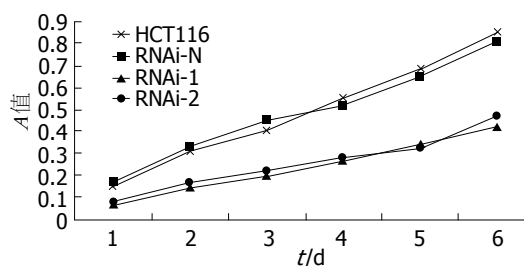


图 2 Skp2RNAi对HCT116细胞增殖的影响.

全相符. 表明退火形成的干扰寡核苷酸成功连接入pRNAT-U6.1/Neo载体. 由于pRNAT-U6.1/Neo载体带有绿色荧光报告基因, 因此, 阴性对照干扰载体、干扰载体H1、H2转染成功的细胞会发出绿色荧光, 表明细胞中有转染的外源基因表达.

2.2 重组质粒转染对Skp2 mRNA表达的影响 未转染组、RNAi-N、RNAi-1和RNAi-2的Skp2/ $\beta$ -actin值分别为:  $0.85 \pm 0.036$ 、 $0.88 \pm 0.038$ 、 $0.28 \pm 0.056$ 和 $0.30 \pm 0.041$ . RNAi-1、RNAi-2转染组的Skp2 mRNA表达明显低于转染RNAi-N和未转染组, 其抑制效率分别为: 68%、66%(图1).

2.3 细胞生长曲线及细胞周期 细胞生长曲线检测: 以时间为横轴, A值(波长为490 nm, 代表活细胞的数量)为纵轴, 分别绘制RNAi-1、RNAi-2、RNAi-N、HCT116细胞的生长曲线. HCT116与阴性对照组RNAi-N细胞相比, 生长速度基本一致. 而干扰组RNAi-1、RNAi-2细胞生长速度减缓(图2).

细胞周期的检测: 根据增殖指数 $(PI) = (S + G_2M) / (G_0/G_1 + S + G_2M)$ 算出HCT116细胞、RNAi-N细胞、RNAi-1和RNAi-2细胞PI值, 分别为 $53.03\% \pm 4.92\%$ 、 $49.05\% \pm 4.50\%$ 、 $30.10\% \pm 1.50\%$ 和 $29.21\% \pm 1.40\%$ . 以上结果提示Skp2的RNA干扰可以使HCT116细胞停滞于 $G_0/G_1$ 期, 明显抑制HCT116细胞的增殖( $P < 0.05$ , 表2).

## 3 讨论

肿瘤的发生是正常细胞染色体多重损伤的复杂过程, 包括抑癌基因的失活, 原癌基因的异常激

### ■应用要点

本文以Skp2为靶基因设计的siRNA表达框架构建siRNA表达载体, 转染后可通过抑制结肠癌细胞增殖而发挥抗肿瘤作用. 设计合成2对靶向Skp2的siRNA, 2对均具有高效性, 寻找到了高效阻断Skp2表达的基因序列.

## ■同行评价

本文具有一定的科学性、创新性和可读性,较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

表 2 Skp2RNAi对HCT116细胞细胞周期分布的影响

	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	PI(%)
HCT116细胞	46.25 ± 4.68	12.45 ± 4.55	41.28 ± 4.49	53.03 ± 4.92
RNAi-N	52.11 ± 5.32	11.30 ± 4.75	37.60 ± 4.40	49.05 ± 4.50
RNAi-1	68.20 ± 3.54	4.35 ± 1.70	25.78 ± 1.45	30.10 ± 1.50
RNAi-2	70.19 ± 1.61	5.44 ± 0.88	24.28 ± 2.55	29.21 ± 1.40

活, DNA转录失控, DNA损伤等. 不论何种原因造成的细胞转化, 其最终表现均为细胞周期调控机制紊乱, 导致细胞失控性生长. 细胞周期是由细胞周期蛋白(Cyclin)和细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)进行正调节, 由细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(CKI)进行负调节. 细胞S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase associated protein 2, Skp2)因能降解一种主要的CKI-p27kip1, 参与了细胞增殖与凋亡的调控, 与肿瘤的发生发展有着密切的关系<sup>[4-5]</sup>. 泛素蛋白酶体途径主要降解胞内泛素化的蛋白质. 泛素经过泛素活化酶E1、泛素结合酶E2及泛素连接酶E3等一系列催化步骤结合底物蛋白, 形成泛素-底物蛋白复合体, 使底物进入26S蛋白酶体内实现泛素化降解. 泛素连接酶复合物SCF(Skp1-Cullin-F-box)的F-box亚基能特异性识别底物并与之结合, 使之进入泛素化降解. Skp2正是F-box蛋白家庭成员之一<sup>[6]</sup>. F-box蛋白Skp2行使特异性识别底物功能, 决定SCF复合体的特异性<sup>[7-8]</sup>.

Skp2是第一个通过基因敲除进行研究的F-box蛋白, 具有原癌基因蛋白功能. 1995年, Zhang *et al*<sup>[9]</sup>在变异的细胞中发现三种蛋白能与Cyclin-CDK2相互作用, 分别命名为p9, p19, p45, 即现在所知的人Cks1(或Cks2)、Skp1和Skp2. 通过向细胞内注射p45抗体或反义寡核苷酸能阻断p45的功能, 使细胞不能进入S期, 故认为p45的表达增加与变异细胞的细胞周期的调控改变有关. 由于p45主要存在于S期, 且与CyclinA相互作用, 故命名为S期激酶相关蛋白2, 即Skp2. 其基因定位于人5号染色体短臂上(5p13), 分子质量约47 kDa<sup>[10]</sup>.

大量研究显示Skp2的表达水平同组织的恶性程度呈正相关. Latres *et al*<sup>[11]</sup>为了评价在体内Skp2对肿瘤的诱导生长情况, 通过对转基因鼠的研究发现, 导入Skp2基因鼠的生存期缩短, 肿瘤的发生率增加. Li *et al*<sup>[12]</sup>发现Skp2在大肠的正常黏膜-腺瘤-原发性大肠癌轴的转变过程中, Skp2表达显著增加. 国内的孙立春 *et al*<sup>[13]</sup>报道Skp2高

表达的大肠癌患者生存期短, 而Skp2低表达的生存期较长, 且认为Skp2高表达与大肠癌高侵袭性有关, 可作为大肠癌的预后指标和治疗的新靶点.

RNAi是一种序列特异的双链RNA分子在mRNA水平关闭相应序列基因的表达或使其沉默的过程. 他主要是通过(外源或内源性的)双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)被核酸酶切割成21-23 nt大小的RNA双链复合物, 即siRNA介导识别并靶向切割同源性靶mRNA分子而实现<sup>[14]</sup>. 本研究根据在线siRNA设计工具设计2条21 nt的Skp2序列作为靶位点, 利用基因重组技术在体外构建Skp2siRNA表达载体, 然后转染高表达Skp2的大肠癌HCT116细胞株, 并使其在细胞中稳定表达. 转染Skp2siRNA后, HCT116细胞的Skp2 mRNA表达均明显减弱, Skp2 mRNA相对β-actin表达量分别为0.85 ± 0.036、0.88 ± 0.038、0.28 ± 0.056、0.30 ± 0.041, 干扰组与阴性对照组和未转染组比较, 有统计学意义( $P < 0.05$ ). 说明构建的两条真核表达载体Skp2 siRNA均具有特异性封闭Skp2表达的作用, 同时应用MTT和流式细胞技术分析细胞的生长曲线和周期分布, 发现Skp2 siRNA能够使细胞增殖速度减慢, 且使HCT116细胞停滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 证实Skp2 siRNA能特异性抑制细胞分裂增殖.

总之, 本研究通过使用靶向Skp2的siRNA, 不仅有效抑制了Skp2基因在转录水平的表达, 还能在体外特异性抑制大肠癌细胞的分裂增殖, 该结果证实了靶向Skp2的RNA干扰技术有望成为一种有效的大肠癌基因治疗手段, 并为大肠癌的联合治疗提供新的靶点和思路.

## 4 参考文献

- 1 Lima CD. Bridging the gap between SCF and ubiquitin transfer. *Structure* 2002; 10: 741-742
- 2 Yokoi S, Yasui K, Saito-Ohara F, Koshikawa K, Iizasa T, Fujisawa T, Terasaki T, Horii A, Takahashi T, Hirohashi S, Inazawa J. A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers. *Am J Pathol* 2002;

- 161: 207-216
- 3 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
- 4 Yamasaki L, Pagano M. Cell cycle, proteolysis and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 623-628
- 5 Lin DI, Diehl JA. Mechanism of cell-cycle control: ligating the ligase. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 453-455
- 6 Yeh KH, Kondo T, Zheng J, Tsvetkov LM, Blair J, Zhang H. The F-box protein SKP2 binds to the phosphorylated threonine 380 in cyclin E and regulates ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 884-890
- 7 Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J Cell Physiol* 2000; 182: 1-11
- 8 DeSalle LM, Pagano M. Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett* 2001; 490: 179-189
- 9 Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D. p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* 1995; 82: 915-925
- 10 Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH. Chromosomal mapping of the genes for the human CDK2/cyclin A-associated proteins p19 (SKP1A and SKP1B) and p45 (SKP2). *Cytogenet Cell Genet* 1996; 73: 104-107
- 11 Latres E, Chiarle R, Schulman BA, Pavletich NP, Pellicer A, Inghirami G, Pagano M. Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2515-2520
- 12 Li JQ, Wu F, Masaki T, Kubo A, Fujita J, Dixon DA, Beauchamp RD, Ishida T, Kuriyama S, Imaida K. Correlation of Skp2 with carcinogenesis, invasion, metastasis, and prognosis in colorectal tumors. *Int J Oncol* 2004; 25: 87-95
- 13 孙立春, 隋广杰, 刘亚琴. SKP2在大肠癌组织中的表达及预后意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2516-2520
- 14 Scherr M, Eder M. Gene silencing by small regulatory RNAs in mammalian cells. *Cell Cycle* 2007; 6: 444-449

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知

**本刊讯** 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2009-07-23/26在南宁市召开第二十一次全国中西医结合消化系统疾病学术会议, 并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为功能性胃肠病、炎症性肠病和消化内镜新技术临床应用演示)新技术新理论继续教育学习班. 学习班招收对象: 中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等. 参加学习班者授予国家级1类继续教育学分; 大会论文报告者另授继续教育学分6分.

#### 1 征稿内容

功能性胃肠病、炎症性肠病中西医结合基础与临床治疗研究; 幽门螺杆菌相关疾病的中西医结合基础与治疗研究; 脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究; 消化系统肿瘤中西医结合诊疗; 脾胃学说及其临床应用; 其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等.

#### 2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编. 稿件请附800字论文摘要, 尽可能以电子信件的形式将稿件传送, 截稿日期: 2009-06-30.

#### 3 联系方式

袁海锋, 朱永苹, 530011, 广西壮族自治区南宁市华东路10号广西中医学院瑞康医院, 电话: 0771-2188107; 13597004049; 13077766271, 传真: 0771-2411156, rkxhmk@sina.com或czs.xiaohua@163.com



# 射频消融治疗对兔肝VX2肿瘤VEGF表达的影响

倪雪君, 成建萍, 周国雄, 于秀, 丁晓凌, 张海峰

## ■背景资料

射频消融作为肝癌治疗的一种新兴疗法, 在临床上应用日益广泛。但是消融不完全和易复发仍然是临床医师倍感棘手的问题, 其中术后残存肿瘤的血管新生起着重要的作用, 并对射频治疗的预后有着重要的影响。

倪雪君, 周国雄, 丁晓凌, 张海峰, 南通大学附属医院消化科 江苏省南通市 226001

成建萍, 南通大学附属医院超声科 江苏省南通市 226001

于秀, 南通大学附属医院外科实验室 江苏省南通市 226001

倪雪君, 主治医师, 主要从事肝癌的诊断和治疗。

南通市社会发展基金资助项目, No. S2006032

作者贡献分布: 本课题由倪雪君、成建萍及周国雄设计; 研究过程由倪雪君、成建萍及于秀操作完成; 数据分析由倪雪君、丁晓凌及张海峰完成; 论文写作由倪雪君、成建萍及周国雄完成。

通讯作者: 成建萍, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院超声科。lily0138@126.com

电话: 0513-85052079 传真: 0513-85519820

收稿日期: 2009-01-20 修回日期: 2009-02-16

接受日期: 2009-03-02 在线出版日期: 2009-03-18

## Effect of radio frequency ablation on vascular endothelial growth factor expression in rabbit liver VX2 tumor models

Xue-Jun Ni, Jian-Ping Cheng, Guo-Xiong Zhou, Xiu Yu, Xiao-Ling Ding, Hai-Feng Zhang

Xue-Jun Ni, Guo-Xiong Zhou, Xiao-Ling Ding, Hai-Feng Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Jian-Ping Cheng, Department of Ultrasonography, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Xiu Yu, Department of Surgical Laboratory, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Social Development Foundation of Nantong City, No. S2006032

Correspondence to: Jian-Ping Cheng, Department of Ultrasonography, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. lily0138@126.com

Received: 2009-01-20 Revised: 2009-02-16

Accepted: 2009-03-02 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of radio frequency ablation (RFA) on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in rabbit liver VX2 tumor models.

**METHODS:** The liver VX2 tumor models were established by planting the tumor tissue suspension into rabbits' liver and then divided into three groups: Control group were killed directly to obtain liver specimens; treat group were

treated with RFA and executed after 4 h and 24 h randomly. And normal rabbit livers were used as the normal group. The expression of VEGF in all groups was detected by immunohistochemistry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** VX2 liver tumor showed infiltrative growth. After RFA, large necrosis in the central ablation area, surrounded by inflammatory response belt and peripheral residual tumor tissue, was observed in the specimens from tumors. By immunohistochemistry and RT-PCR, the protein and gene expressions of VEGF in the control group were higher than those in the normal group (VEGF-mRNA/GAPDH-mRNA  $1.3048 \pm 0.1936$  vs  $0.8993 \pm 0.1107$ ,  $P < 0.05$ ), while those in treatment group (4 h:  $0.7388 \pm 0.1503$ ; 24 h:  $0.8935 \pm 0.1936$ ) were decreased obviously as compared with the control group (both  $P < 0.05$ ). However, there was no significant difference in the expression of VEGF in the tumor tissue among the different time points of the RFA group ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** RFA treatment can effectively down-regulate the protein and gene expression of VEGF, inhibit the angiogenesis and reduce the blood supply, thus may reduce tumor relapse and metastasis.

**Key Words:** Radio frequency ablation; VX2 liver tumor; Vascular endothelial growth factor; Immunohistochemical

Ni XJ, Cheng JP, Zhou GX, Yu X, Ding XL, Zhang HF. Effect of radio frequency ablation on vascular endothelial growth factor expression in rabbit liver VX2 tumor models. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 780-784

## 摘要

**目的:** 探讨射频消融(RFA)对兔肝VX2肿瘤血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响。

**方法:** 建立日本大耳白兔肝VX2肿瘤模型, 随机分为3组: 对照组直接处死取肝脏标本; RFA治疗(4 h和24 h)组于射频消融后4 h和24 h处

## ■同行评议者

钱林学, 教授, 首都医科大学附属北京友谊医院内科

死取出肝脏组织,并以正常兔肝脏组织为正常对照,通过免疫组织化学方法和逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)方法检测VEGF的蛋白和基因表达。

**结果:** VX2肿瘤浸润性生长,射频后中央消融区呈现大片坏死,周围见炎性反应带,外围癌组织残留。免疫组化和RT-PCR示对照组肿瘤组织VEGF的蛋白和基因表达均高于正常组(VEGF/GAPDH基因灰度比:  $1.3048 \pm 0.1936$  vs  $0.8993 \pm 0.1107$ ,  $P < 0.05$ ),射频消融后4 h和24 h表达明显下降(VEGF/GAPDH基因灰度比:  $0.7388 \pm 0.1503$ ,  $0.8935 \pm 0.1936$ , 均  $P < 0.05$ ),但不同时间段并无明显差异。

**结论:** RFA治疗能下调肿瘤VEGF基因和蛋白水平的表达,抑制血管生成,减少血供,进而降低了复发和转移几率。

**关键词:** 射频消融; VX2肿瘤; 血管内皮生长因子; 免疫组化

倪雪君, 成建萍, 周国雄, 于秀, 丁晓凌, 张海峰. 射频消融治疗对兔肝VX2肿瘤VEGF表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 780-784

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/780.asp>

## 0 引言

射频消融(radio-frequency ablation, RFA)以其适应证广泛、创伤小、安全性高已经成为肝癌治疗的一种新兴疗法,但是消融不完全和易复发仍然是临床医师倍感棘手的问题,大肝癌尤其如此<sup>[1]</sup>。本实验通过控制移植肿瘤的大小和RFA的范围,使部分肿瘤组织残留,通过免疫组化染色和RT-PCR观察残癌组织中VEGF的表达,探讨RFA对残癌组织血管生成的影响,以了解RFA治疗肝癌的分子机制,为RFA治疗肝癌寻求进一步的依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 日本大耳白兔20只,雌雄不限,兔龄4-6 mo,体质量 $2.5 \pm 0.5$  kg,由南通大学实验动物中心提供。VX2肿瘤种兔1只,南通大学公共卫生学院惠赠。冷循环型射频治疗仪购自美国Radionics公司; Acuson Sequoia 512超声仪购自德国西门子公司; VEGF多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 引物由上海生工合成: 内参GAPDH引物上游: 5'-ATGGGAAGCTG GTCATCAAC-3', 下游: 5'-TTCAGCTCTGGGAT

GACCTT-3', 扩增产物大小为258 bp。VEGF的引物上游: 5'-CTTGCTGCTCTACCTCCAC-3', 下游5'-ATGTCCACCAAGGTCTCG-3', 扩增产物大小为144 bp。TRIzol、RT-PCR试剂盒分别购自立陶宛Invotrigen和Fermentas MBI公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 VX2肝肿瘤动物模型制作:** 采用瘤组织悬液注射法: 切取VX2肿瘤种兔生长旺盛的肿块剪碎制成组织悬液备用。将15只实验用兔以30 mL/L戊巴比妥钠按30 mg/kg经耳缘静脉注射麻醉后,仰卧固定于自制手术台,备皮局部消毒,于剑突下1 cm略偏左作3-5 cm纵行切口,逐层切开入腹。暴露兔肝脏,以无菌纱布牵引左叶至腹腔外,以20 mL注射器针尖注入瘤组织悬液1 mL,按压2 min待无血液渗出回纳肝脏,依次缝合切口,再次消毒,每日2次肌注青霉素 $2 \times 10^5$  U共3 d预防感染。

**1.2.2 分组及处理:** 肿瘤种植10 d-2 wk内行超声检查,待肿瘤直径达 $2.5 \pm 0.5$  cm,将荷瘤兔随机分为3组: 对照组(5只)直接处死取肝脏标本; RFA治疗两组(4、24 h各5只)麻醉后,背部脱毛,将射频电极插入肝脏肿瘤中心,调节功率为55-60 W,时间3-4 min,形成直径约2 cm的消融区,周边残留0.5-1.0 cm的肿瘤,术后分别在4 h和24 h处死5只兔子取出肝脏标本。另外再取5只正常兔肝脏以作为正常对照。将所取标本部分常规中性甲醛固定24 h,石蜡包埋,4  $\mu$ m切片,HE染色;部分立即置于-80℃冰箱。

**1.2.3 免疫组化法检测VEGF蛋白的表达:** 免疫组化染色采用EnVision两部法: 石蜡切片于二甲苯中脱腊,梯度酒精脱水; 30 mL/L的 $H_2O_2$ 室温孵育10 min; 1:50的VEGF抗体室温孵育1 h; 1:50二抗室温孵育30 min; DAB显色,苏木素复染,树胶封片,用PBS液代替一抗作为阴性对照,以已知的阳性片作为阳性对照。以镜下观察肿瘤细胞胞质内及胞膜出现棕黄色颗粒为VEGF表达阳性细胞,免疫组化评分(immunohistochemical scores HIS)参照文献[2],首先按染色强度评分: 无色为0分,弱阳性为1分,中度阳性为2分,强阳性为3分; 然后按阳性细胞率评分: 肿瘤细胞内无阳性染色者为0分,阳性细胞率 $\leq 10\%$ 为1分,11%-50%为2分,51%-80%为3分, >80%为4分。将二者相乘得综合免疫组化评分: 0定为-, 1-4分为+, 5-8分为++, 9-12分为+++。

**1.2.4 RT-PCR检测VEGF基因mRNA表达的变化:** 按TRIzol试剂说明书提取总RNA,紫外分光光度

### ■ 研发前沿

目前为了提高RFA治疗肝癌的疗效,临床上多倾向于将数种微创手段序贯使用或者与化疗结合,该举措确实收到较好的效果。有文献报道RFA联合亚砷酸治疗可以减少肿瘤组织的MVD,并抑制VEGF的表达。

### ■相关报道

射频术后肿瘤的血管新生情况与预后有着重要的关联。有文献表明,射频可以破坏肿瘤微血管,抑制肿瘤VEGF表达,减少肿瘤的血供供应,从而降低术后转移复发的几率;如与化疗联合应用则效果更佳。但也有文献认为射频可以促进肿瘤旁组织的VEGF表达,值得进一步的研究。

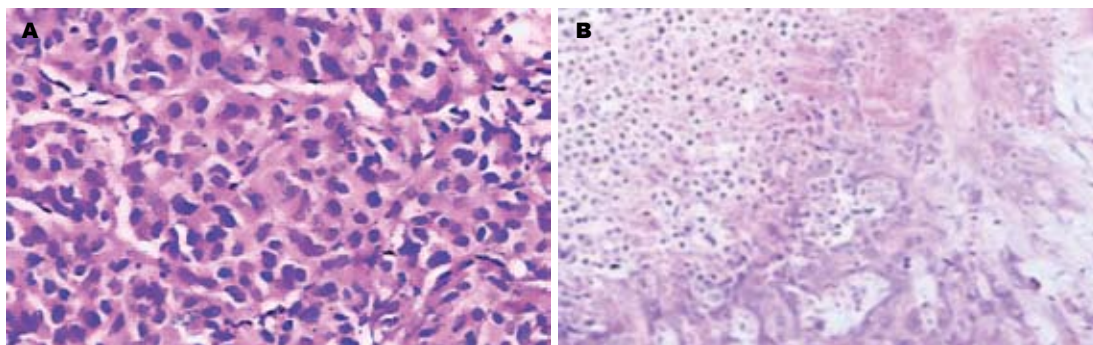


图1 肝脏组织RFA前后的HE染色. A: RFA前( $\times 200$ ); B: RFA后坏死区外围见炎症反应带和残存肿瘤( $\times 100$ ).

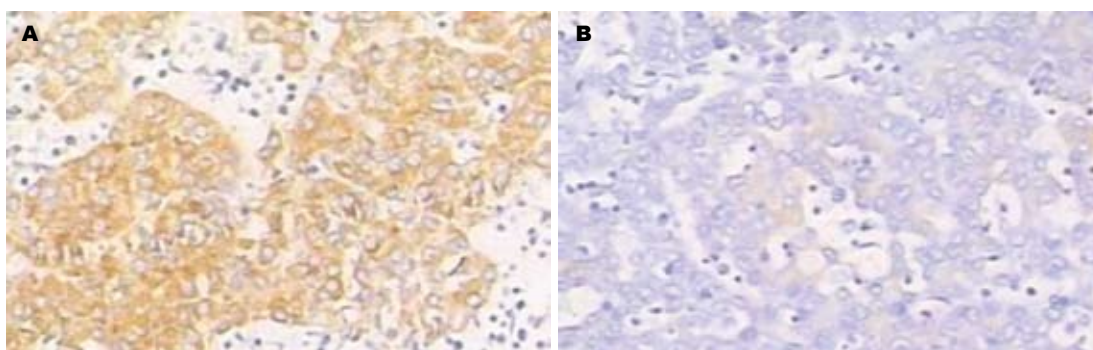


图2 肝脏组织RFA前后的VEGF免疫组化染色( $\times 200$ ). A: RFA前; B: RFA后.

测定其浓度和纯度,逆转录成cDNA,PCR方法扩增目的基因VEGF及内参GAPDH. PCR反应条件:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性40 s, 退火40 s(GAPDH退火温度为 $58^{\circ}\text{C}$ 、VEGF的退火温度 $56^{\circ}\text{C}$ ),  $72^{\circ}\text{C}$  延伸60 s, 34个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸7 min. 扩增产物以12 g/L琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像分析仪进行摄像,观察mRNA的表达。

**统计学处理** 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,用Stata 7.0软件进行秩和检验及 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肝脏肿瘤大体形态** 对照组肿瘤呈圆形,体积较大时可分为分叶状,白色,质韧,无明显包膜,切面呈鱼肉状,部分病灶中心有液化性坏死呈奶酪样;射频治疗后,消融中心呈现灰白色的凝固性坏死,周围见充血和出血带,外围肝组织为暗红色。

**2.2 组织学病理改变** VX2肿瘤呈浸润性生长,无包膜,肿瘤细胞巢片状或假腺样分布,排列紧密,紊乱,细胞体积大,形态不规则,胞质嗜双色性,核大小不一,深染,核染色质粗,核仁明显。消融治疗后镜下呈现3个区带, RFA中心区为大片不定形坏死组织;周边见炎症反应带,其内较多中

表1 兔肝脏VEGF表达变化 ( $n = 5$ )

分组	表达情况分级			
	-	+	++	+++
正常组	4	1	0	0
对照组	0	1	2	2 <sup>a</sup>
射频组术后4 h	1	3	1	0
射频组术后24 h	2	3	0	0 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 对照组。

性粒细胞、淋巴细胞以及红细胞聚集;外围为残存的癌组织,肿瘤细胞与对照组形态类似(图1)。

**2.3 免疫组化法检测VEGF的表达** VEGF阳性细胞表现为胞质内及胞膜黄染。正常组肝组织内VEGF低表达;对照组肿瘤组织内VEGF呈现高表达,尤以肿瘤边缘为主;RFA后,中央坏死区无VEGF表达,残存肿瘤内VEGF表达较对照组变低(图2,表1)。

**2.4 RT-PCR检测VEGF mRNA表达的变化** 正常组VEGF mRNA较弱表达,其灰度与GAPDH的比值为 $0.8993 \pm 0.1107$ ;对照组VEGF mRNA表达上调,比值为 $1.3048 \pm 0.1936$ ,明显高于正常组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );射频术后VEGF mRNA表达均较对照组明显下调,术后4 h比值

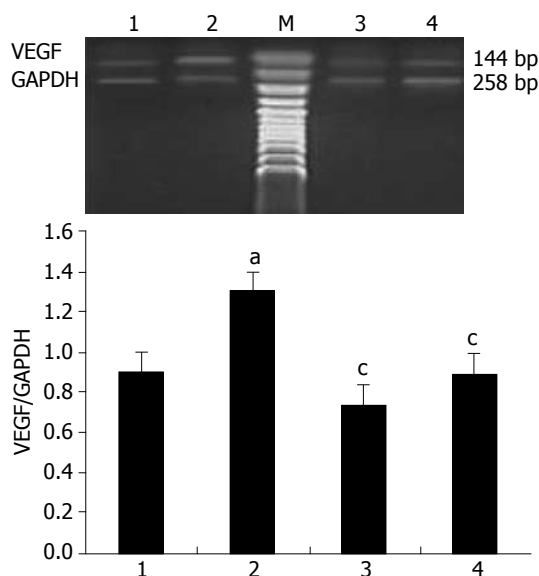


图3 RFA前后VEGF mRNA表达的变化。1: 正常组; 2: 对照组; 3: 射频后4 h组; 4: 射频后24 h。\* $P<0.05$  vs 正常组; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 对照组。

为 $0.7388 \pm 0.1503$ , 术后24 h为 $0.8935 \pm 0.1936$ , 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ); RFA术后4 h和24 h两组间VEGF mRNA表达差异无统计学意义(图3)。

### 3 讨论

肿瘤的生长、浸润与转移依赖于肿瘤血管形成, 如果没有新生血管供应营养, 肿瘤在达到1-2 mm的直径后, 就无法进一步生长, 而步入凋亡阶段。体内外实验已证实, 血管形成的增加继发于血管生成因子表达的增加, 从而促进肿瘤的生长和转移; 而下调血管生成因子表达, 则肿瘤新生血管减少, 继而降低肿瘤在原发灶和转移灶的生长<sup>[3]</sup>。在目前所发现的30多种血管生长因子中, VEGF是最重要的血管新生促进因子<sup>[4]</sup>。VEGF大部分由肿瘤细胞产生并分泌<sup>[5]</sup>, 与相应受体结合, 自身以二硫键形成二聚体后, 激活酪氨酸激酶, 使得受体发生磷酸化并活化其下游配体, 通过一系列信号转导机制发挥生物学效应。VEGF具有增加微血管通透性、促进内皮细胞有丝分裂及迁移, 促进血管生成, 降低癌细胞的同质黏附性, 在乏氧条件下通过上调Bcl-2的表达抑制肿瘤细胞凋亡<sup>[6]</sup>, 介导肿瘤细胞增殖<sup>[7]</sup>等多种作用, 在多种肿瘤的生长、发展和转移过程中起重要作用<sup>[8]</sup>, 与肿瘤的分级、预后等密切相关<sup>[9]</sup>。Raskopf *et al*<sup>[10]</sup>发现通过靶向VEGF的siRNA能降低肿瘤的微血管密度, 抑制肝癌的生长。

射频治疗肿瘤的根本机制是利用肿瘤的不

耐热性, 以高温直接引起肿瘤细胞的凝固性坏死, 但亦可以介导肿瘤细胞凋亡<sup>[11]</sup>, 破坏肿瘤微血管, 抑制血管新生<sup>[12-13]</sup>, 从而破坏术后生长、复发、转移的条件, 但射频对于肿瘤血管生成分子生物学方面的影响目前尚无进一步的研究报道。我们的实验以VX2肿瘤组织悬液成功制作移植肝癌模型, 此瘤体由肝动脉供血, 血供丰富, 生长迅速, 容易转移, 其生物学活性可以很好模拟原发性和转移性肝癌的情况<sup>[14]</sup>。在实验中, 我们通过控制移植肿瘤的大小和RFA的范围, 使边缘的肿瘤组织残留, 继而对残存肿瘤细胞行免疫组化和半定量RT-PCR, 观察VEGF蛋白和mRNA的表达, 发现其表达明显低于对照组: 对照组的基因灰度比VEGF/GAPDH为 $1.3048 \pm 0.1936$ , 而RFA后4 h下降至 $0.7388 \pm 0.1503$ , 术后24 h为 $0.8935 \pm 0.1936$ ( $P<0.05$ )。至于残余肿瘤的VEGF蛋白表达明显下调的机制, 有人认为可能是RFA的热效应导致肿瘤细胞失活, 也可能是大量坏死组织诱导的免疫反应抑制了肿瘤VEGF的表达<sup>[15]</sup>。我们有理由认为RFA还引起了VEGF基因表达的下调从而使得其蛋白合成相应减少, 继之影响了肿瘤的血管生成。

无论是手术切除还是包括射频在内的各种局部微创治疗, 其治疗效果与术后是否有肿瘤残留及残余肿瘤的血管新生情况密切相关, 大肝癌更是如此<sup>[16]</sup>。目前为了彻底消除肿瘤, 临床上多将数种微创手段如TACE和RFA等序贯使用, 也确实收到较好疗效<sup>[17-18]</sup>。尽管如此, 残余肿瘤的血管新生情况仍然值得进一步研究。我们的研究显示: RFA不仅可以直接引起肿瘤组织的凝固性坏死和微血管的破坏, 还能下调坏死周边的残余肿瘤细胞VEGF的基因和蛋白表达, 抑制残余肿瘤的血管形成, 减少其血供, 从而有效的降低了复发和转移率。但是RFA引起瘤组织破坏的同时, 亦可造成组织缺氧, 而缺氧恰恰能诱导VEGF的大量分泌<sup>[19]</sup>, 因此RFA是否会在术后更长的时间段引起VEGF反馈性的增加, 有待于日后的深入研究。

### 4 参考文献

- Kim YS, Rhim H, Cho OK, Koh BH, Kim Y. Intrahepatic recurrence after percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: analysis of the pattern and risk factors. *Eur J Radiol* 2006; 59: 432-441
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000; 89: 2637-2645
- Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Ling MT, Wang

### ■应用要点

本研究发现: 残存肿瘤的VEGF基因表达下调, 这可能是VEGF蛋白表达下降的内在原因。该研究结果有助于深入了解射频治疗的分子机制, 为RFA治疗肝癌寻求进一步的依据。



## ■同行评价

本文内容较好, 设计合理, 结果可靠, 具有较好的学术价值.

- XH, Wong YC, Guan XY, Man K, Tang ZY, Fan ST. Regulation of angiogenesis by Id-1 through hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ -mediated vascular endothelial growth factor up-regulation in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6910-6919
- 4 Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676
- 5 Barr MP, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JJ. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for breast tumour cells under hypoxia. *Int J Oncol* 2008; 32: 41-48
- 6 Wang D, Weng Q, Zhang L, He Q, Yang B. VEGF and Bcl-2 Interact Via MAPKs Signaling Pathway in the Response to Hypoxia in Neuroblastoma. *Cell Mol Neurobiol* 2008 Dec 2. [Epub ahead of print]
- 7 Liang Y, Brekken RA, Hyder SM. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 905-919
- 8 Zhao J, Hu J, Cai J, Yang X, Yang Z. Vascular endothelial growth factor expression in serum of patients with hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2003; 116: 772-776
- 9 Shariat SF, Anwuri VA, Lamb DJ, Shah NV, Wheeler TM, Slawin KM. Association of preoperative plasma levels of vascular endothelial growth factor and soluble vascular cell adhesion molecule-1 with lymph node status and biochemical progression after radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1655-1663
- 10 Raskopf E, Vogt A, Sauerbruch T, Schmitz V. siRNA targeting VEGF inhibits hepatocellular carcinoma growth and tumor angiogenesis in vivo. *J Hepatol* 2008; 49: 977-984
- 11 Netto GJ, Altrabulsi B, Katabi N, Martin P, Burt K, Levy M, Sanchez E, Watkins DL, Jennings L, Klintmalm G, Goldstein R. Radio-frequency ablation of hepatocellular carcinoma before liver transplantation: a histologic and 'TUNEL' study. *Liver Int* 2006; 26: 746-751
- 12 郭晓华, 沈世强. 射频消融对兔肝癌肿瘤微血管密度及血管内皮细胞生长因子的影响. *腹部外科* 2004; 17: 365-367
- 13 孔文韬, 陈骏, 仇毓东, 张炜炜. 射频消融对鼠肝肿瘤血管内皮生长因子及其受体Flk-1表达的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2255-2259
- 14 张洪新, 刘燕, 曹伟, 王执民, 郭卫平, 王义清, 李文献, 倪代会, 刘毅勇, 樊爱琳. 兔肝VX2移植瘤改良模型的建立. *肿瘤防治研究* 2002; 29: 123
- 15 张盟辉, 孔宪炳, 王巧玲, 阴红卫, 轩诗进. 射频消融联合亚砷酸局部治疗对兔肝VX2肿瘤MVD和VEGF表达的影响. *中国普外基础与临床杂志* 2007; 14: 19-22
- 16 Murakami T, Ishimaru H, Sakamoto I, Uetani M, Matsuoka Y, Daikoku M, Honda S, Koshiishi T, Fujimoto T. Percutaneous radiofrequency ablation and transcatheter arterial chemoembolization for hypervascular hepatocellular carcinoma: rate and risk factors for local recurrence. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2007; 30: 696-704
- 17 Cheng BQ, Jia CQ, Liu CT, Fan W, Wang QL, Zhang ZL, Yi CH. Chemoembolization combined with radiofrequency ablation for patients with hepatocellular carcinoma larger than 3 cm: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 299: 1669-1677
- 18 Gao HJ, Liang HH, Chen MS, Peng ZW, Zhang YJ, Li P, Pang XH, Zhang YQ, Li JQ. [Effectiveness of radiofrequency ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2008; 88: 2529-2532
- 19 Hendriksen EM, Span PN, Schuurin J, Peters JP, Sweep FC, van der Kogel AJ, Bussink J. Angiogenesis, hypoxia and VEGF expression during tumour growth in a human xenograft tumour model. *Microvasc Res* 2009; 77: 96-103

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

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

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (常务副总编辑: 张海宁 2009-03-18)

## Par-3及Connexin在结直肠肿瘤中的表达变化

刘俊, 刘胜洪, 刘金林, 赵刚, 张维康

刘俊, 刘金林, 赵刚, 张维康, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022

刘胜洪, 华中科技大学同济医学院基础学院 湖北省武汉市 430030

刘俊, 医学博士, 副主任医师, 主要从事胃肠外科领域的研究。

作者贡献分布: 刘俊和刘胜洪对此文所作贡献均等; 此课题由刘俊与刘胜洪设计; 研究过程由刘俊、刘胜洪、刘金林及赵刚操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由刘胜洪提供; 数据分析由张维康完成; 本论文写作由刘俊与刘胜洪完成。

通讯作者: 刘俊, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科. ly8hao@yahoo.com.cn

电话: 027-85351620

收稿日期: 2009-01-08 修回日期: 2009-02-12

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-18

### Changes in expression of Connexin and Par-3 in colorectal cancer

Jun Liu, Sheng-Hong Liu, Jin-Lin Liu, Gang Zhao, Wei-Kang Zhang

Jun Liu, Jin-Lin Liu, Gang Zhao, Wei-Kang Zhang, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Sheng-Hong Liu, School of Basic Medical Science, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Jun Liu, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. ly8hao@yahoo.com.cn

Received: 2009-01-08 Revised: 2009-02-12

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-18

### Abstract

**AIM:** To study the expression change and characteristics of Connexin and protease activated receptor 3 (Par-3) and to investigate their clinical significance in colorectal tumor.

**METHODS:** The 51 tissue samples were collected and divided into three groups: tumor tissue group, tissue adjacent to tumor group (2.0 cm), and normal tissue group (apart from tumor >5.0 cm) respectively. Morphological changes of cells were observed using electronic microscopy, histopathological changes were detected using HE staining, and the expressions of Connexin and Par-3 were detected immunohistochemistry and Western blot.

**RESULTS:** The tumor tissue was deformed and epithelium polarity was vanished, compared with normal tissue. On electronic microscopy, the organelles of the tumor epithelium was in disorder and the structure of cell junctions, such as tight junction, intermediate junction were disarranged or disappeared. For normal tissue group, epithelial cells were regular in shape, the cell polarity was clear, and the cell junction structure was integrated. Immunohistochemistry showed the expression levels of Connexin and Par-3 were gradually decreased, in such order as normal tissue group ( $0.572 \pm 0.051$ ,  $0.485 \pm 0.042$ ), tissue adjacent to tumor group ( $0.432 \pm 0.049$ ,  $0.367 \pm 0.035$ ), and tumor tissue of colorectal group ( $0.290 \pm 0.041$ ,  $0.227 \pm 0.031$ ). There had been significant difference among them ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Down-regulation of Connexin and Par-3 expression is premonition for cancer cell aggravation and metastasis.

**Key Words:** Protease-activated receptor-3; Cell junction; Colorectal tumor; Metastasis

Liu J, Liu SH, Liu JL, Zhao G, Zhang WK. Changes in expression of Connexin and Par-3 in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 785-789

### 摘要

**目的:** 研究Connexin、Par-3在结直肠肿瘤组织中的表达变化及特征, 探讨其临床意义。

**方法:** 选取2007-05/2008-03在本院诊断治疗结直肠肿瘤患者51例, 取材肿瘤组织并分为3组: 肿瘤组织、癌旁组织(2.0 cm)和正常组织(距肿瘤>5.0 cm)。电镜下观察肿瘤细胞形态变化, HE染色观察肿瘤组织病理变化, 免疫组化及Western blot检测Connexin、Par-3的表达。

**结果:** 肿瘤上皮细胞形态不规则, 细胞极性消失, 细胞器排列紊乱, 细胞连接结构破坏, 紧密连接、中间连接和桥粒结构基本消失。正常上皮细胞形态规则, 细胞极性明显, 细胞连接结构完整。免疫组化检测显示: 正常肠道组

### ■背景资料

结直肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 而消化系上皮细胞侧面连接是维持上皮组织的整体性的条件之一, 也是癌变细胞必定干扰的结构区。胃肠道相邻上皮细胞膜上的Connexin在nectin蛋白的介入下促进募集细胞表面黏附分子形成分子互锁而构成牢固细胞连接, nectin的胞内端则与Par-3结合, 共同参与细胞连接结构的维持和调节。Par-3分子表达下降, 可使细胞连接分子表达下降, 细胞连接松散, 导致细胞分化的改变, 或肿瘤转移的发生。

### ■同行评议者

秦华东, 教授, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

## ■研究前沿

研究结直肠肿瘤细胞生物学特性, 以及与细胞连接相关蛋白分子的表达变化及规律, 不仅是基础医学研究工作的重点, 对其诊断和治疗也具有重要的临床意义。

组织中Par-3与Connexin的表达水平最高( $0.572 \pm 0.051$ ,  $0.485 \pm 0.042$ ), 癌旁组织次之( $0.432 \pm 0.049$ ,  $0.367 \pm 0.035$ ), 癌组织表达水平最低( $0.290 \pm 0.041$ ,  $0.227 \pm 0.031$ ); 三种组织两两之间的差异性检测有极显著的统计学意义( $P < 0.05$ )。

**结论:** Connexin和Par-3的表达下调极可能是癌细胞恶变程度加重与复发转移的前兆。

**关键词:** 蛋白酶激活受体-3; 细胞连接; 结直肠肿瘤; 转移

刘俊, 刘胜洪, 刘金林, 赵刚, 张维康. Par-3及Connexin在结直肠肿瘤中的表达变化. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 785-789

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/785.asp>

## 0 引言

结直肠癌是消化系常见的恶性肿瘤, 占消化系统肿瘤发病率的第2位<sup>[1]</sup>, 及早发现和准确诊断结直肠癌转移或复发, 与结直肠癌患者临床治疗效果及预后有密切关系<sup>[2-3]</sup>. 因此, 相关的研究一直受到重视。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取2007-05/2008-03在本院诊断治疗结直肠肿瘤患者51例, 男23例, 女28例, 年龄 $56 \pm 2.5$ 岁. 所有病例术前经过纤维结肠镜检查 and 活组织病理诊断确诊, 组织学分型: 管状腺癌16例, 乳头状腺癌14例, 黏液腺癌21例. 每1病例取材分别为癌组织、肿瘤组织、癌旁2.0 cm组织和距肿瘤>5.0 cm正常组织。

### 1.2 方法

**1.2.1 组织病理学处理:** 取材组织经过生理盐水冲洗以后, 剪成体积约为 $0.8 \text{ cm}^3$ 小块置入40 g/L多聚甲醛固定24 h, 组织在0.01 mol/L PBS中漂洗1 h, 用酒精上行脱水、透明、石蜡包埋、切片、粘片备用。

取材组织剪成直径为 $1 \text{ mm}^3$ 左右的小块, 经过生理盐水冲洗以后, 置入2.5%的戊二醛(0.1 mol/L PB配制)固定24 h. 用0.01 mol/L PBS中漂洗 $30 \text{ min} \times 3$ 。

组织经丙酮脱水(60%、70%、80%、90%、100%), 每一步的时间为2 h. 浸透与包埋. Epon-812作为电镜包埋剂, 先用丙酮与Epon-812按1:1配成预包埋剂, 浸透过夜; 将组织浸入到Epon-812包埋剂中, 浸透后置入包埋器内,  $60^\circ\text{C}$ , 24 h, 完成包埋, 组织块修整, 电镜切片机切片,

贴铜网, 电镜观察。

**1.2.2 免疫组化SABC法显色:** 切片常规脱蜡后用0.01 mol/L PBS漂洗, 30 mL/L  $\text{H}_2\text{O}_2$ 阻断内源性过氧化物酶活性. 再用4% BSA进行封闭; 滴入一抗(connexin26和Par-3为Sant Cruz公司产品), 每组织块30  $\mu\text{L}$ . 将切片放入湿盒,  $4^\circ\text{C}$ 过夜后室温2 h. 生物素标记的二抗 $37^\circ\text{C}$ , 1 h, 0.01 mol/L PBS稀释SABC,  $37^\circ\text{C}$ , 1 h, B显色. 切片用苏木素复染30 s, 自来水冲10 min. 上行酒精脱水, 透明, 封片。

**1.2.3 肿瘤组织总蛋白提取方法:** 临床手术切除癌组织, 癌旁组织和正常组织分别置于裂解液(50 mmol/L pH7.5 Tris-Cl, 100 mL/L glycerol, 5 mmol/L 醋酸镁, 0.2 mmol/L EDTA, 1 g/L Leupeptin, 1 g/L Pepstatin, 1 g/L Aprotinin, 15.41 g/L DTT, 0.42 kg/L NaF, 0.08 kg/L 钒酸钠, 17.4 g/L PMSF, 50 mol/L  $\text{NaN}_3$ )中, 匀浆后,  $0^\circ\text{C}$ 静置60 min. 超声震荡3 min, 低温离心9000 r/min, 15 min, 取上清液 $-20^\circ\text{C}$ 保存, 待用。

**1.2.4 Western blot:** 取上述匀浆的上清于100 g/L SDS-PAGE凝胶上进行电泳分离后蛋白湿转入硝酸纤维膜上. 50 g/L牛奶封闭30 min; Par-3和Connexin(1:500)(Santa Cruz公司产品) $4^\circ\text{C}$ , 18 h; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:2500, 北京中杉),  $37^\circ\text{C}$ 孵育1 h; ECL显色曝光。

用Bandscan4.3, 对每个目的条带进行总灰度的分析, 并与 $\beta$ -actin的值相比, 进行标准化。

**统计学处理** 所有的结果用mean $\pm$ SD表示, 并用 $t$ 检验进行两两比较,  $P < 0.05$ 在统计学上有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 组织病理学观察** 实验所收集的病理标本主要为黏液腺癌和管状、乳头状腺癌, 肉眼可见肿瘤组织向肠腔内隆起, 外观呈红色, 质地坚硬, 形状不规则, 与癌旁组织和与远离癌组织的正常肠道黏膜组织(图1A-B)有明显差别. 上皮细胞失去正常规律排列, 肠腺形状不一, 失去规则, 肠腔大小不一, 癌组织上皮细胞连接松散, 脱落(图1C)。

**2.2 电镜形态变化** 正常上皮细胞形态规则, 细胞极性明显, 细胞器排列清晰, 细胞连接结构完整, 紧密连接、中间连接和桥粒结构由表及里, 细胞间隙不明显. 可见明显的细胞连接复合体, 即紧密连接、中间连接和桥粒。

癌细胞形态不规则, 细胞极性消失, 细胞器

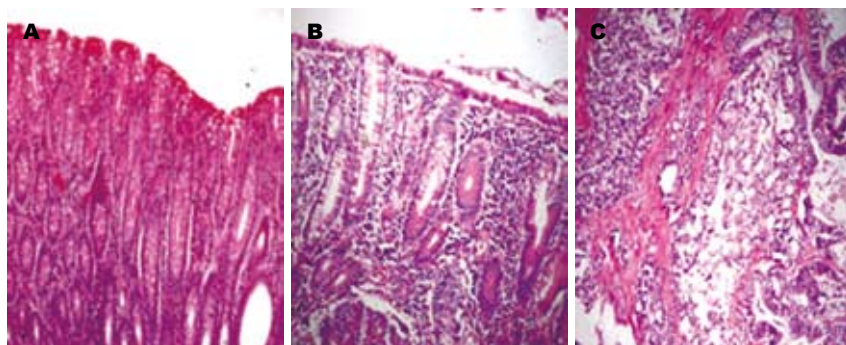


图 1 直肠癌组织及癌周组织(H-E  $\times 400$ ). A-B: 癌旁组织和与远离癌组织的正常肠道黏膜组织; C: 癌组织上皮细胞失去正常规律排列.

#### ■相关报道

尽管Par-3在肿瘤研究方面报道较少,已有研究显示上皮细胞向肿瘤细胞方向转化早期,即细胞发生间变时,首先表现为细胞连接的破坏.

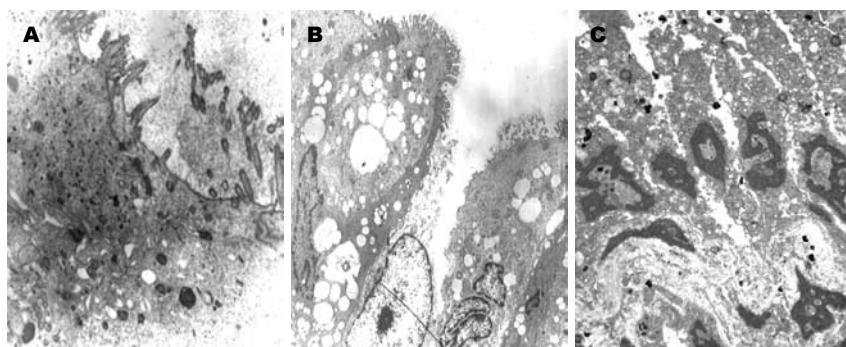


图 2 结直肠癌组织电镜形态变化. A: 癌组织细胞极性消失, 细胞器排列紊乱; B: 癌组织细胞连接结构破坏; C: 较低分化的癌组织细胞连接完全破坏, 细胞间隙增宽.

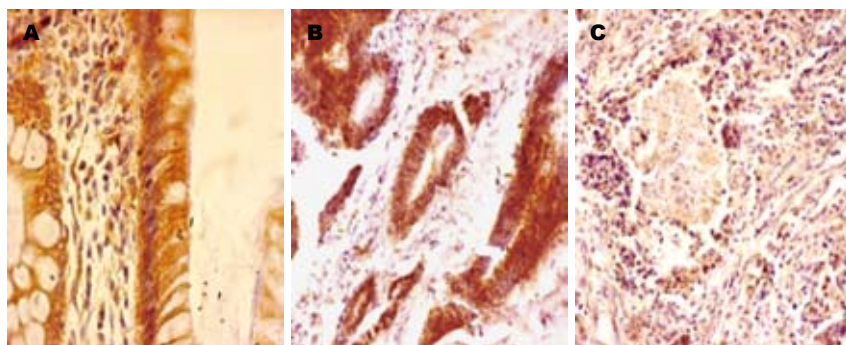


图 3 Connexin免疫细胞化学染色(SABC  $\times 400$ ). A: 正常肠道表达上皮Connexin反应阳性定位于细胞膜表面; B: 癌旁组织; C: 癌组织肠腺上皮细胞Connexin反应阳性明显减弱或消失.

排列紊乱, 细胞连接结构破坏, 紧密连接、中间连接和桥粒结构基本消失, 有些上皮细胞的细胞连接复合体破坏(图2A-B), 在较低分化的癌细胞中, 细胞连接完全破坏, 细胞间隙增宽(图2C).

**2.3 Connexin免疫细胞化学反应结果** 光镜下, Connexin免疫细胞化学反应阳性产物主要定位于肠上皮细胞膜表面(图3A). 在癌旁周组织中, 黏膜上皮细胞轮廓不清晰, Connexin反应呈阳性(图3B). 但在某些低分化的腺癌组织中肠腺结构已不完整, 腺细胞排列紊乱, 数量较少, 散在分布于结缔组织中, 其腺上皮细胞Connexin免疫反应明显减弱, 腺上皮周围结缔组织中, Connexin免疫反应呈阴性显示(图3C).

**2.4 Par-3免疫细胞化学反应结果** 正常肠腺上皮细胞中, Par-3呈阳性点状表达, 定位于上皮细胞胞质或近顶部胞膜处, 常呈颗粒状分布(图4A). 中度分化的腺癌管腔变小, 散在分布在组织中, 腺上皮中Par-3免疫细胞化学反应减弱(图4B);

低分化的腺癌组织中肠腺结构已不完整, 腺细胞排列紊乱, 数量较少, 其腺上皮细胞Par-3免疫反应明显减弱, Par-3表达下降更明显(图4C).

**2.5 Western blot 免疫印迹反应的吸光度显示结果提示**, 正常肠道组织Connexin、Par-3表达水平明显最高, 癌旁组织表达水平次之, 癌组织表达水平最低(图5). 三种组织两两之间的差异性检测,  $P$ 值明显小于0.05, 有极显著的统计学意义(表1).

### 3 讨论

消化系上皮细胞侧面连接是维持上皮组织的整体性的条件之一, 也是癌变细胞必定干扰的结构区<sup>[4-7]</sup>. 研究发现胃肠道相邻上皮细胞膜上的Connexin可以通过侧面同类分子的相互锁定(interlock)而构成牢固细胞连接<sup>[8]</sup>. 这种连接的形成需要一种被称为nectin蛋白的介入<sup>[9]</sup>, 他促进募集细胞表面黏附分子形成分子互锁. 而nectin



### ■名词解释

Par-3: 又称为细胞极性(polarity)蛋白分子, 广泛分布于机体的多种组织和细胞中, 对机体细胞功能调节具有重要作用, 尤其是对上皮细胞连接的形成、维持以及重建均起着重要作用。

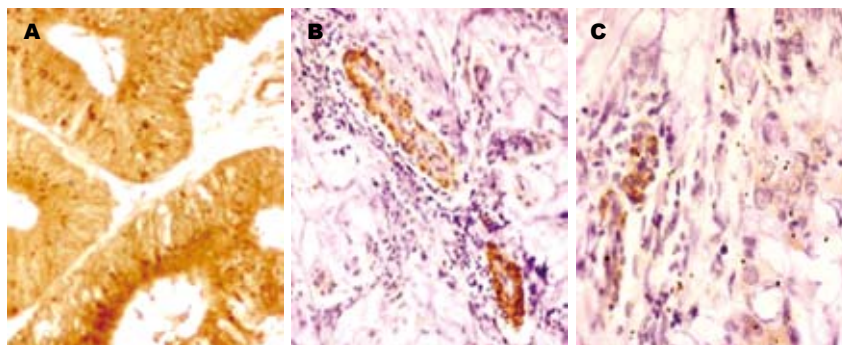


图 4 直肠癌组织及癌周组织Par-3免疫细胞化学染色(SABC × 400). A: 正常肠腺上皮细胞 Par-3反应呈阳性, 反应产物呈颗粒状, 位于上皮近顶部; B: 癌旁组织; C: 癌组织上皮细胞 Par-3表达明显下调。

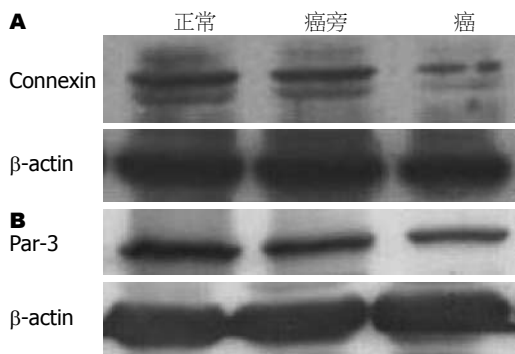


图 5 三种组织中Connexin及Par-3的表达. A: Connexin; B: Par-3.

表 1 结直肠癌、癌旁组织和正常组织Connexin、Par-3吸光度比值 (mean ± SD)

组织类型	Par-3	Connexin
正常	0.485 ± 0.042	0.572 ± 0.051
癌旁组织	0.367 ± 0.035 <sup>a</sup>	0.432 ± 0.049 <sup>a</sup>
癌组织	0.227 ± 0.031 <sup>ac</sup>	0.290 ± 0.041 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 正常组织; <sup>c</sup>P<0.05 vs 癌旁组织。

的胞内端则与调节分子Par-3结合<sup>[10]</sup>, 共同参与细胞连接结构的维持和调节. Par-3又称为细胞极性(polarity)蛋白分子, 广泛分布于机体的多种组织和细胞中, 对机体细胞功能调节具有重要作用, 尤其是对上皮细胞连接的形成、维持以及重建均起着重要作用<sup>[11-14]</sup>. 基因敲除Par-3分子, 可使细胞连接分子表达下降<sup>[15]</sup>, 细胞连接松散, 导致细胞分化的改变, 或肿瘤转移的发生<sup>[16]</sup>. 但目前关于肠道肿瘤上皮细胞Par-3与Connexin表达之间的相关性研究目前尚无报道。

本实验初步观察的结果显示, 癌组织上皮细胞连接松散, 与癌旁组织和远离癌组织的正常肠道黏膜组织有明显差别. 电镜下可以观察到肿瘤上皮细胞形态不规则, 细胞极性消失, 细胞器排列紊乱, 细胞连接结构破坏, 紧密连接、中间连接和桥粒结构基本消失, 细胞间隙增宽。

本研究免疫组织化学和免疫印迹的结果均显示, 正常肠腺上皮细胞中, Par-3呈阳性点状表达, 定位于上皮细胞胞质或近顶部胞膜处; 中度分化的腺癌管腔变小, 散在分布于组织中, 腺上皮中Par-3免疫细胞化学反应减弱; 低分化的腺癌组织中肠腺结构不完整, 腺细胞排列紊乱, 数量较少, 散在分布结缔组织中, 腺上皮中Par-3免疫细胞化学反应几乎消失, 腺上皮周围结缔组织中, Par-3免疫反应呈阴性; 与Par-3反应阳性

腺上皮相比, Par-3表达下降更明显. Par-3免疫印迹反应的定量分析结果显示癌组织中Par-3的表达也明显下调. 这与Connexin的表达结果基本一致, 提示他们之间存在一定的协调关系. Yano和Nambara *et al*在体外肿瘤细胞培养实验中观察到Connexin存在类似表达现象<sup>[17-18]</sup>, 与我们在肿瘤组织切片中的观察的结果基本一致, 因而可以认为Connexin与肿瘤的形成和分化程度有密切关联. 但肿瘤细胞Par-3表达的类似研究, 目前尚未见文献报导. 可以推测直肠肿瘤组织中Connexin表达下调, 可能是导致上皮细胞松散脱落, 细胞出现转化、间变或复发等变化的关键原因之一. 但Par-3与Connexin的表达变化一致的意义目前尚不清楚, 具体的机制需要进一步分子生物学的证实。

尽管Par-3在肿瘤研究方面报道较少, 已有研究显示上皮细胞向肿瘤细胞方向转化早期, 即细胞发生间变时, 首先表现为细胞连接的破坏. 文献报道, Par-3与Par-6和aPKC是以一种蛋白复合体的形式存在, 与细胞连接的形成和维持有很重要的关系<sup>[19]</sup>. 研究发现某些原因使Par-3表达下调时, 会使复合体Par-6和aPKC分子从细胞膜向胞质转位, 其结果使上皮细胞极性消失, 连接松散, 细胞出现间变特征<sup>[20]</sup>. TGF-β可下调E-cadherin表达, 但这一作用可被过表达Par-3逆转, 因此可以认为, Par-3不仅对细胞侧面连接的蛋白分子的表达具有重要的调控<sup>[19]</sup>. 而且也可能是上游因子作用的靶点, 上游因子通

过Par-3调控下游的细胞连接分子的表达, 进而对上皮细胞的连接结构进行调控。

总之, 由于Connexin和Par-3与细胞连接有关的, 可以推测Par-3和Connexin表达下调可视为细胞间变或恶变的早期信号, 他们的表达变化有助于确定肿瘤细胞恶变程度加重与转移的前兆, 因此, 本研究结果对结直肠癌的分类、预后判断及处理可能具有一定的临床意义。

#### 4 参考文献

- 1 Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2137-2150
- 2 崔恒官, 曹秀峰. 手术为主的大肠癌综合治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1774-1780
- 3 Nystrom M, Mutanen M. Diet and epigenetics in colon cancer. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 257-263
- 4 Meyer L, Meyer F, Dralle H, Ernst M, Lippert H, Gastinger I. Insufficiency risk of esophagojejunal anastomosis after total abdominal gastrectomy for gastric carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 2005; 390: 510-516
- 5 de Carvalho AD, de Souza W, Morgado-Díaz JA. Morphological and molecular alterations at the junctional complex in irradiated human colon adenocarcinoma cells, Caco-2. *Int J Radiat Biol* 2006; 82: 658-668
- 6 Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2525-2532
- 7 Li Z, Zhou Z, Donahue HJ. Alterations in Cx43 and OB-cadherin affect breast cancer cell metastatic potential. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25: 265-272
- 8 Fiorini C, Gilleron J, Carette D, Valette A, Tilloy A, Chevalier S, Segretain D, Pointis G. Accelerated internalization of junctional membrane proteins (connexin 43, N-cadherin and ZO-1) within endocytic vacuoles: an early event of DDT carcinogenicity. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 56-67
- 9 Rikitake Y, Takai Y. Interactions of the cell adhesion molecule nectin with transmembrane and peripheral membrane proteins for pleiotropic functions. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 253-263
- 10 Iden S, Rehder D, August B, Suzuki A, Wolburg-  
Buchholz K, Wolburg H, Ohno S, Behrens J, Vestweber D, Ebnet K. A distinct PAR complex associates physically with VE-cadherin in vertebrate endothelial cells. *EMBO Rep* 2006; 7: 1239-1246
- 11 Chan JR, Jolicœur C, Yamauchi J, Elliott J, Fawcett JP, Ng BK, Cayouette M. The polarity protein Par-3 directly interacts with p75NTR to regulate myelination. *Science* 2006; 314: 832-836
- 12 Wells CD, Fawcett JP, Traweger A, Yamanaka Y, Goudreaux M, Elder K, Kulkarni S, Gish G, Virag C, Lim C, Colwill K, Starostine A, Metalnikov P, Pawson T. A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell* 2006; 125: 535-548
- 13 Pilot F, Philippe JM, Lemmers C, Lecuit T. Spatial control of actin organization at adherens junctions by a synaptotagmin-like protein Btsz. *Nature* 2006; 442: 580-584
- 14 Ooshio T, Fujita N, Yamada A, Sato T, Kitagawa Y, Okamoto R, Nakata S, Miki A, Irie K, Takai Y. Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions. *J Cell Sci* 2007; 120: 2352-2365
- 15 Lees-Miller SP. The double (strand break) life of Par-3. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 363-365
- 16 Mizuno K, Suzuki A, Hirose T, Kitamura K, Kutsuzawa K, Futaki M, Amano Y, Ohno S. Self-association of PAR-3-mediated by the conserved N-terminal domain contributes to the development of epithelial tight junctions. *J Biol Chem* 2003; 278: 31240-31250
- 17 Yano T, Yamasaki H. Regulation of cellular invasion and matrix metalloproteinase activity in HepG2 cell by connexin 26 transfection. *Mol Carcinog* 2001; 31: 101-109
- 18 Nambara C, Kawasaki Y, Yamasaki H. Role of the cytoplasmic loop domain of Cx43 in its intracellular localization and function: possible interaction with cadherin. *J Membr Biol* 2007; 217: 63-69
- 19 Wang X, Nie J, Zhou Q, Liu W, Zhu F, Chen W, Mao H, Luo N, Dong X, Yu X. Downregulation of Par-3 expression and disruption of Par complex integrity by TGF-beta during the process of epithelial to mesenchymal transition in rat proximal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1782: 51-59
- 20 Hirose T, Izumi Y, Nagashima Y, Tamai-Nagai Y, Kurihara H, Sakai T, Suzuki Y, Yamanaka T, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S. Involvement of ASIP/ PAR-3 in the promotion of epithelial tight junction formation. *J Cell Sci* 2002; 115: 2485-2495

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

#### ● 消息 ●

### 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志 2007年影响因子 0.568

本刊讯 2007年世界华人消化杂志的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28种期刊的第5位. 2007年世界华人消化杂志的影响因子为0.568, 内科医学类28种期刊的第15位. 即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54. (编辑: 程剑侠 2009-03-18)

# 食管肠神经系统调控的研究进展

张晓艳, 谢鹏雁

## ■背景资料

食管拥有一个丰富的内在神经元网络, 分布于黏膜下层和环肌纵肌之间。食管的活动有赖于肠神经系统(ENS)的调控协调作用。由于肠道神经系统具有明显的自律性、节律性、稳定性、可调性, 其又被称为“肠脑”或“微型脑”(little brain)。肠神经系统的神经元中有许多种神经递质, 如一氧化氮、血管活性肠多肽、垂体腺苷酸环化酶激活多肽、降钙素基因相关肽、一氧化氮等。多种神经递质共同作用调节了食管的功能。

张晓艳, 中国人民解放军空军总医院干部病房5区 北京市 100142

谢鹏雁, 北京大学第一医院消化内科 北京市 100034

作者贡献分布: 本综述由张晓艳整理完成; 谢鹏雁审核。

通讯作者: 张晓艳, 100142, 北京市海淀区阜成路30号, 中国人民解放军空军总医院干部病房5区, zhangxiaoyan1024@263.net

收稿日期: 2008-12-30 修回日期: 2009-02-04

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-18

## Research progress of enteric nervous system in esophagus

Xiao-Yan Zhang, Peng-Yan Xie

Xiao-Yan Zhang, Section 5, Ward of Cadre Care, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China  
Peng-Yan Xie, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Beijing University, Beijing 100034, China

Correspondence to: Dr. Xiao-Yan Zhang, Section 5, Ward of Cadre Care, Air Force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100142, China. zhangxiaoyan1024@263.net

Received: 2008-12-30 Revised: 2009-02-04

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-18

## Abstract

The functions of esophageal peristalsis and contraction were regulated and controlled by both neural and humoral system at all levels. Esophageal function depends on coordination of all the effectors regulated by enteric nervous system (ENS). Esophageal neurons are generally divided into two groups: the excitatory neurons and the inhibitory neurons. They regulate the tone, peristalsis and contraction of esophagus by interaction of various neurotransmitters. This article reviews recent research advancement of ENS in esophagus.

Key Words: Esophagus; Enteric nervous system; Neurotransmitter

Zhang XY, Xie PY. Research progress of enteric nervous system in esophagus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 790-797

## 摘要

食管受到各级神经系统及体液的调控, 而完成蠕动与收缩功能。食管的活动有赖于肠神经系统(enteric nervous system, ENS)的调控协调作

用。食管存在着兴奋性神经元和抑制性神经元两种, 他们通过多种神经递质相互作用而决定食管的紧张度、蠕动与收缩。对食管神经机制的理解及研发新型药物治疗食管功能紊乱和胃食管反流有重要意义。本文综述近十年来食管脑神经系统的研究进展。

关键词: 食管; 肠神经系统; 神经递质

张晓艳, 谢鹏雁. 食管肠神经系统调控的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 790-797

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/790.asp>

## 0 引言

食管拥有一个丰富的内在神经元网络, 分布于黏膜下层(如meissner丛)和环肌纵肌之间(如auerbach丛)。肠神经系统(enteric nervous system, ENS)通过迷走神经和胸腔神经节中的肾上腺能神经节接受来自中枢神经系统的指令并向中枢系统传导信息。即使是在与中枢神经系统分离的情况下, 肠神经系统也能产生平滑肌部分的次级蠕动<sup>[1]</sup>。由于肠道神经系统具有明显的自律性、节律性、稳定性、可调性, 其又被称为“肠脑”或“微型脑”(little brain)<sup>[2]</sup>。肠神经系统的神经元中有许多种神经递质, 如一氧化氮、血管活性肠多肽、垂体腺苷酸环化酶激活多肽、降钙素基因相关肽、一氧化氮等。多种神经递质共同作用调节了食管的功能。本文综述了近年来食管肠神经系统研究的结果, 为进一步防治食管动力性疾病, 如反流性食管炎、贲门失弛缓症等, 提供了新的策略。

## 1 食管体部上段横纹肌部分的脑神经系统特点

大部分人认为这段横纹肌是“经典”的骨骼肌纤维组成, 食管横纹肌的神经支配最近研究表明为协同神经支配, 即迷走神经和肠神经元共同支配, 前者是通过疑核神经元神经输出引起胆碱能迷走运动神经元顺次兴奋, 激活了位于横纹肌纤维运动终板上的烟碱受体而完成的<sup>[3-4]</sup>; 后者可表达神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide

## ■同行评议者

伊力亚尔·夏合丁, 教授, 新疆医科大学第一附属医院胸外科; 王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

synthase, nNOS)、血管活性肠多肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)、神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)和促生长激素神经肽(galanin, GAL), 从而调整了神经肌肉的信息传递<sup>[5-7]</sup>。同时胆碱能对肠神经元也可通过疑核运动终板作用而增强影响, 作为对背部运动神经核输出的补充<sup>[5]</sup>。研究表明, 肠源性神经纤维与食管横纹肌接触于专门的位点, 并且食管的收缩呈“从头到尾”的顺序, 发生于胆碱能运动终板对于神经控制食管肌肉的起明确功能之后, 这点不同于食管平滑肌部分的非特异性的“延续效应(hangover)”<sup>[5]</sup>。

在鼠的研究中, CGRP存在于疑核的背群中, 疑核的背群主要传出神经支配食管的横纹肌, 含CGRP的交感神经运动神经元包含乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)并且在其作用下可使乙酰胆碱受体合成增加, 说明了食管运动性交感神经元中, CGRP和ACh是协同递质<sup>[8]</sup>。在鼠食管, NADPH-硫辛酰胺脱氢酶-阳性的神经纤维与运动终板相关联并延伸至肠肌从神经节, 这说明肠神经元广泛的(可能是硝基能性)共同支配的食管的横纹肌纤维, 为肠神经元共同支配横纹肌的提供了新证据<sup>[7,9]</sup>。用双倍免疫组织化学染色显示鼠食管横纹肌运动终板是由CGRP免疫活性的轴突与一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)和GAL免疫活性纤维共同支配<sup>[5,8]</sup>。平均起来, 91%的NOS末端是具有GAL免疫活性的。通过认定CGRP末端的存在, NOS-免疫活性的纤维显示存在于在67%的端板。切断左边迷走神经和喉上神经, 并用15 d的时间使末端退化, 这造成CGRP纤维的缺失, 但不影响横纹肌NOS-免疫活性的纤维的密度。食管肠肌从神经节NOS-免疫活性的神经细胞体其中74%是GAL免疫活性的。由此, 可推导出NOS/GAL纤维发源于食管壁的神经节。食管壁没有CGRP-免疫活性的神经细胞体存在<sup>[5]</sup>。CGRP-免疫活性的细胞在正常黏膜中很稀少, 但在食管炎的黏膜中则显著增加。食管的黏膜上皮内的郎格罕氏细胞含有可以充当免疫调节剂的CGRP<sup>[10]</sup>。

然而, 尽管免疫组织化学的发现高度提示硝基能自主性神经调节(通过肠神经元)横纹肌收缩, 仍然不能证明一氧化氮(nitric oxide, NO)介导了横纹肌的活动<sup>[11]</sup>。把整个拥有迷走神经网络(包括环路神经网络)食管切断, 并放在已氧化的Krebs-Ringer缓冲液的器官池中, 应用一

个力转换器测量纵向方向的收缩度。横纹肌的反应数量并不受VIP和GAL的影响, 而他们引起了平滑肌反应的抑制; 应用外源性的NO-供体减少了平滑肌收缩的1.6%, 但是对横纹肌的收缩并无显著的影响。因此, 这些免疫组织学上的发现起在生理学上的关系仍然不清楚<sup>[11]</sup>。

## 2 食管体部下段平滑肌部分的脑神经系统特点

食管体下段平滑肌的周围神经支配为植物性的, 迷走神经胸前分支节前纤维末梢在食管周围形成神经丛(periesophageal plexus)并进入食管壁, 与肠间丛神经元形成突触联合<sup>[12]</sup>其后再发出节后纤维支配平滑肌。支配食管的交感神经多源于胸髓T<sub>5</sub>T<sub>6</sub>中侧柱细胞体, 末梢终止于食管肌间丛。交感神经或迷走神经兴奋及其递质去甲肾上腺素或乙酰胆碱都会引起食管黏膜肌层的收缩。

食管平滑肌反应是多种神经递质的作用结果。应用选择性拮抗剂可以分离出食管的兴奋因子和抑制因子, 这一点可以支持上述假说。最初的抑制作用可能部分由包含VIP的神经元参与, 这种神经元是存在于食管体的。神经元(尤其是对河豚毒素敏感的神经元)介导的松弛可以部分由VIP抗血清阻滞, 而对“关闭”收缩的收缩力和期间无影响, 阿托品可以抑制“关闭”收缩<sup>[13]</sup>。NO与神经肽如VIP, CGRP和GAL共存; 但很少与NPY和P物质(substance P, SP)共存, 提示神经元对食管蠕动的控制可能是通过释放NO及其他抑制性神经肽, 例如, CGRP, GAL, VIP, 而不是通过兴奋性物质的作用, 如NPY和SP<sup>[14]</sup>。

NO与食管的抑制性神经元相关。NO由L-精氨酸在NO合成酶的催化下产生, 并存在于肠肌层中<sup>[15]</sup>。NO合成酶抑制剂减少了离体食管环肌(circular muscle, CM)“关闭”收缩的潜伏期和振幅, 亦减少了离体食管对吞咽产生的收缩的潜伏期和振幅<sup>[16]</sup>。吞咽可引起食管纵肌(longitudinal muscle, LM)收缩从而使食管缩短。然而在离体实验中, NO并不对食管纵肌有收缩作用, 而是对于收缩前组织有抑制作用。NOS在吞咽时引起的活体食管的缩短的抑制作用可能是继发于他对食管环肌收缩性的作用<sup>[17]</sup>。NOS抑制剂减少了收缩潜伏期的梯度, 所以食管平滑肌对吞咽的收缩反应几乎是同时的。在活体中注入重组人类血红蛋白, 可以通过与NO结合而使其失活, 从而参与了食管的活动, 如LES松弛及突发性食管的痉挛<sup>[18]</sup>。这些研究表明内源性NO或相关的化合物参与协调了吞咽与逐渐收缩

### ■研究前沿

速激肽类通过介导胃肠中的非肾上腺素能非胆碱能(NANC)而导致的胃肠运动兴奋, 但是他们在食管蠕动中的作用仍然不清楚。



### ■相关报道

研究表明,肠源性神经纤维与食管横纹肌接触于专门的位点,并且食管的收缩呈“从头到尾”的顺序,发生于胆碱能运动终板对于神经控制食管肌肉的起明确功能之后,这点不同于食管平滑肌部分的非特异性的“延续效应”。

之间的潜伏期,从而参与协调了整个食管体的蠕动<sup>[17-18]</sup>。此外,过氧化物根 $O_2^-$ 结合NO后形成了过氧化亚硝酸盐,抑制了NO生物活性。应用抗氧化物酶抑制剂,可使由神经介导的食管环肌收缩潜伏期和“关闭”应答显著缩短,提示了食管壁内神经存在抗氧化物酶,可能在调节由NO介导的食管神经肌肉信息传递中起重要作用<sup>[19]</sup>。这些酶在阻滞酸引起食管黏膜损伤中亦起了一种显著作用<sup>[20-21]</sup>。

速激肽类(tachykinins)通过介导胃肠中的非肾上腺素能非胆碱能(non-adrenergic non-cholinergic, NANC)而导致的胃肠运动兴奋,但是他们在食管蠕动中的作用仍然不清楚。速激肽类引起了环肌和纵肌浓度依赖性的紧张性减低,并且神经激肽受体也参加了这一作用。速激肽类引起的人食管体环肌收缩是通过了激活神经激肽受体所致。这一过程可被磷阿米酮敏感酶调节。引起人食管收缩运动的主要神经递质为ACh,速激肽类通过作用于神经激肽受体而引起人食管体环肌收缩,提示了除了胆碱能途径还有其他的兴奋性机制在起作用<sup>[22]</sup>。

### 3 下食管括约肌神经递质的研究

下食管括约肌(lower esophageal sphincter, LES)位于胃食管结合处(esophagogastric junction, EGJ),解剖学上,LES毗邻胃小弯处为半环肌纤维而毗邻胃大弯处为纵向肌纤维。LES解剖学上的特征决定了神经支配及神经递质的分布不对称,并由此产生了不对称性压力分布图<sup>[23]</sup>。LES紧张度主要源于并依靠于平滑肌特性,其通过L型钙离子通道完成;而LES压力可以被肠运动神经元、交感神经和副交感神经以及神经递质调控。下食管括约肌的兴奋主要是由ACh介导的。ACh无论是对活体或离体的LES都具有兴奋作用,并且这种兴奋可以被阿托品所阻断。NPY和SP同样参与了LES的兴奋。LES的松弛是由多种神经递质相互影响而产生的。在食管末端的肠肌层神经元中共存着NOS、VIP、CGRP等,这也支持了多种神经递质共同支配LES松弛这一机制<sup>[23]</sup>。而LES无论兴奋性神经元还是抑制性神经元,均与Cajal间质细胞有密切联系,参与神经信号的传递。下面将分别叙述存在于LES的主要神经递质及Cajal间质细胞。

3.1 乙酰胆碱 ACh是LES的最主要的兴奋性神经递质。许多的实验证明了无论是在离体还是活体情况下,ACh均可引起LES环肌和纵向肌的兴

奋<sup>[24]</sup>。乙酰胆碱能神经元大部分位于LES的左侧壁,右侧壁由轴突支配,这可能是LES左侧压力较右侧为高的原因<sup>[25]</sup>。LES肌纤维胆碱能的收缩均为 $M_3$ 受体介导的<sup>[26]</sup>。 $M_1$ 受体主要存在于肌间神经丛内,胃肠道平滑肌内含量很少<sup>[27]</sup>。 $M_2$ 受体在人食管平滑肌内表达最多,但几乎不介导其收缩反应<sup>[28]</sup>。 $M_4$ 受体在平滑肌中作用很少,敲出 $M_4$ 受体基因的小鼠胃底平滑肌对卡巴胆碱反应与野生小鼠无差异,可以排除其作用<sup>[29]</sup>。阿托品是 $M_3$ 受体的拮抗剂,但目前仍未发现高选择的拮抗剂,不能通过药理学方法证明 $M_5$ 受体的作用<sup>[30]</sup>。ACh对LES的作用主要是通过 $M_3$ 受体激活磷脂酶C,产生三磷酸肌醇(inositol triphosphate, IP3)而发挥作用的。ACh和IP3对LES的兴奋依赖于细胞内 $Ca^{2+}$ 的释放和 $Ca^{2+}$ -钙调蛋白( $Ca^{2+}$ -calmodulin, CaM)依赖途径的激活作用。而小剂量ACh或IP3通过蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)介导途径维持LES静息压。在LES从PKC-依赖途径向CaM-依赖途径的转换是通过细胞内钙离子浓度调节的<sup>[31]</sup>。

3.2 速激肽类 速激肽类通过速激肽NK2受体途径参与了LES的收缩。神经肽Y及P物质均属于速激肽类神经递质。速激肽类神经递质通过L型钙离子通道而使肌细胞膜去极化,引起LES的收缩<sup>[23]</sup>。研究表明,在人、猪、狗LES中,VIP和NPY由相同的神经元合成,储存在相同的轴突末梢,同时释放作用于括约肌细胞<sup>[32]</sup>。NPY对电刺激、神经介导的纵行肌收缩产生剂量依赖性抑制,提示了NPY可能作用于突触前来抑制胆碱能传输。NPY可以抑制八肽缩胆囊素引起的食管肌肉收缩,并且这种抑制作用与NO无关<sup>[9]</sup>。肽药理学作用提示NPY起到了调节平滑肌紧张度的作用。食管失弛缓症者LES含有NPY和SP的神经纤维减少;而在食管裂孔疝和胃食管返流患者的标本中,可以观察到很多的NYP纤维。证明了NPY在LES调节中起到了重要的作用<sup>[33]</sup>。

SP免疫相关性神经纤维在豚鼠和猫的食管下端中数量很多,在肠肌丛和黏膜下丛分布较多,在环肌和纵向肌及黏膜也有分布。免疫组化学证明,SP存在于迷走神经末梢的分支中<sup>[34]</sup>。电刺激猪的迷走神经使LESP升高了8倍,同时SP的分泌明显改变<sup>[35]</sup>。SP对猫食管环状肌的作用:不仅增加了平滑肌的收缩并且加强了其对电刺激的反应。上述研究结果支持了生理学研究上提出的迷走神经传入纤维在食管蠕动起到的效应器的作用是通过释放SP完成的这一理论,食管

末端SP可能作为对化学伤害感受刺激的神经递质, 加强食管平滑肌的收缩反应<sup>[34]</sup>.

3.3 NO 是主要的LES抑制性神经递质, 他通过介导NANC引起LES的松弛和反弹性收缩. LES中的nNOS是NO的酶源<sup>[23]</sup>. nNOS的生物活性依赖于Ca<sup>2+</sup>和钙调蛋白, 由其产生的NO主要起神经递质和第二信使作用. 许多体内体外研究表明, 应用了NOS抑制剂抑制了NOS使神经元介导的LES松弛受阻. 很多神经递质与NO一起共同参与了LES的松弛. 然而到目前为止, 只有ATP或相关嘌呤及蜂毒明肽敏感神经递质被证明与NO参与了LES的松弛<sup>[35]</sup>. ATP通过蜂毒明肽敏感-Ca<sup>2+</sup>活化-K<sup>+</sup>钾通道影响了快速抑制性神经肌肉接头电位(inhibitory junction potentials, IJPs), NO通过cGMP途径而不是AMP依赖性蛋白激酶(cAMP-dependent protein kinase, PKG)途径介导了另一部分的快速IJPs, 以及缓慢IJPs<sup>[36]</sup>.

NO作为支配LES神经中抑制性神经肽能神经递质能引起LES松弛, 其机制: 目前认为一方面NO可能是一过性食管下端括约肌舒张(transient lower esophageal sphincter relaxation, TLESR)的启动因子, NO具有脂溶性, 能通过生物膜迅速扩散, 他被合成后不储存于突触颗粒中而是立即释放, 到达靶细胞不作用于细胞表面受体而是与细胞内的鸟苷酸环化酶结合并提高该酶活力使细胞内环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)生成增多, 降低细胞内钙离子浓度或对钙离子的敏感性, 引起肌肉松弛, LES松弛及“关闭”反应<sup>[35-36]</sup>; 另一方面使依赖cGMP的蛋白激酶活性上升, 促使蛋白磷酸化使肌肉松弛, 从而使LES松弛; 此外NO又是一种炎性递质, 可与超氧化物反应产生过氧亚硝酸盐, 后者可加速脂类和巯基化合物的氧化反应, 引起食管急慢性炎症反应, 造成食管黏膜的损伤.

在食管不同功能部分, NOS神经纤维的分布密度不同. 含有NOS的神经纤维存在于肠肌丛, 黏膜下丛和肌黏膜丛<sup>[37]</sup>. NOS神经纤维约有69%分布在肠肌丛<sup>[9]</sup>. 在环肌层, NOS的神经纤维在食管体上段分布的很多, 朝向LES处有显著减少; 在纵肌层和纵肌方向的肌黏膜中, NOS的神经纤维在胃食管括约肌处大量分布, 并向横纹肌和平滑肌交界处显著减少<sup>[14]</sup>. NOS神经纤维约有30%-40%存在于壁内神经节及其延伸的神经纤维束中. 在壁内神经节中的无NOS免疫活性的神经细胞的间隙中, 存在着NOS免疫活性

神经细胞以束状形式存在并最终膨大形成末端神经. 穿过食管壁各层的血管旁伴行有含免疫活性的神经纤维-血管周围丛. 这说明: NO参与神经传导并控制食管的蠕动、紧张度及TLESR. 食管下段的一些氮能神经纤维可促进感觉运动功能<sup>[37]</sup>.

应用NO合酶阻滞剂NG-甲基-L-精氨酸(L-Arginine, L-NMMA)研究人类内源性NO对吞咽的影响, 可以发现L-NMMA灌注显著减少收缩期间并且加快起始传播速度但是并不改变收缩的幅度, 而且这一作用可以被NOS底物L-精氨酸转复. LES静息状态的紧张度可以因为灌注了L-NMMA而显著的提高, 这些效应都可以被L-精氨酸逆转. 提示了在人类, 内源性的NO参与, 至少是部分参与, 食管下段部分和LES运动的生理调节<sup>[38]</sup>. 一些LES迷走神经抑制性通路神经节阻滞剂如阿托品、六甲胺和5-甲氧二甲胺可以显著对抗由于吞咽和刺激迷走神经引起的LES松弛, 但是却不能影响由于气囊膨胀引起的LES松弛. NOS抑制剂, N-硝基-L-精氨酸甲基酯, 显著的抑制了由于刺激迷走神经, 吞咽及气囊膨胀引起的LES松弛, 而且这一作用可以被L-精氨酸转复. 这些研究表明, 气囊诱导的LES松弛通过壁内丛途径, 而不是像迷走神经抑制性途径那样通过神经节传递信息. 然而无论何种刺激引起的LES松弛, 最后的递质都是NO<sup>[39]</sup>. 在活体或离体中, 急性的酒精作用抑制了LES的收缩性. 乙醇显著的减少了LES紧张度并不由NO介导, 而乙醇增强了LES的“打开”松弛反应是NO介导的. 内毒素脂多糖可引起LES基本状态剂量依赖型抑制, 并且由于刺激NANC而增强了LES松弛, 其原因可能是因为nNOS及其产物NO活性的增加<sup>[40]</sup>.

也有观点认为LES环肌的收缩机制与纵肌不同, 环肌主要不是由于NO的抑制性神经元的作用, 而是由于胆碱能神经兴奋关闭所致<sup>[41]</sup>.

3.4 CO 内源性CO和NO类似, 是近年研究证实的重要的生物调节物质, 具有传递细胞间信息、调节细胞功能的作用. CO也参与了LES的松弛. 血红素氧合酶(haem oxygenase, HO)可在应激或损伤条件下诱导产生CO, CO是一种弥散的气体信使分子, 可以传递生理学信息, 从而具有抗炎、抗凋亡、抗增生作用<sup>[42-44]</sup>. 在猫的LES中, 对产生CO的HO的定位, 发现HO的免疫活性定位在黏膜下丛和肠肌丛神经细胞胞体中, 并且大约50%含有HO免疫活性的肠肌丛神经细胞胞

#### ■应用要点

在食管存在着兴奋性神经元和抑制性神经元两种, 他们通过多种神经递质相互作用而决定食管的紧张度、蠕动与收缩. 对食管神经机制的理解及研发新型药物治疗食管功能紊乱和胃食管反流有重要意义.

### ■同行评价

本文较全面综述了食管肠神经系统的作用与功能,有一定临床意义。

体同时也包含有NOS和VIP免疫活性。HO的免疫活性也定位在于神经纤维,分散于平滑肌及动脉内膜的非神经细胞中,并且类似于NO,在分离的LES环形平滑肌,CO产生浓度依赖性的舒张。这种舒张伴随着cGMP的上升,而不是环磷酸苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP),CO通过可溶性鸟苷酸环化酶-环磷酸鸟苷途径,通过胞内肌浆网钙离子的释放,使平滑肌细胞舒张,肌肉松弛。舒张平滑肌HO基因缺失可引起平滑肌持续痉挛,外源性CO则能恢复平滑肌的正常反应<sup>[45]</sup>。这种松弛反应可以被亚甲蓝降低,河豚毒素对其没有作用。反复的暴露于CO下,会造成渐进性的松弛作用减低。CO还可以调节肠道平滑肌的电活动,通过平滑肌细胞内cGMP生成,激活平滑肌细胞的K<sup>+</sup>通道,增加整个细胞的外向电流,引起膜电位超极化。CO可能参与了VIP,组氨酸异亮氨酸肽(peptide histidine isoleucine, PHI)和垂体腺苷酸环化酶激活多肽(pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PACAP)介导的松弛,因为抑制CO合成酶HO会直接导致这些肽类引起的松弛反应的改变,使其产生的浓度依赖性曲线的右侧移位<sup>[45]</sup>。总之,HO的免疫活性定位在猫LES的神经、非神经细胞。LES可以产生CO和CO对环形平滑肌的松弛作用提示:CO起到外周信使作用。

NO和CO是近年发现的生物活性物质,具有传递生物信息等多种生物学功能,可以协同传递,而且NO/NOS和CO/HO有交互作用。已有报道,在多种组织或培养的细胞中NO能诱导HO-1 mRNA和蛋白的表达;依赖于NO的平滑肌松弛反应与CO有关,CO可增加肠道平滑肌对NO作用的敏感性,在CO缺失下NO并不能发挥效应;诱导型一氧化氮合酶(inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)可促成溃疡形成,HO则可使溃疡愈合<sup>[46]</sup>,细胞外信号调节激酶的活化通过iNOS可引起细胞死亡,HO-1则可以保护细胞。最近研究表明,应激或损伤诱导HO-1的表达可清除自由基,抑制iNOS表达,保护肠道免受多种类型的损伤<sup>[47-49]</sup>。

**3.5 血管活性肠多肽、组氨酸异亮氨酸肽、垂体腺苷酸环化酶激活多肽** 在LES中,VIP神经元有65%与NOS神经元共存于肌肠丛神经元,LES黏膜下丛也存在含VIP的神经元<sup>[23]</sup>。VIP是一种介导LES松弛的抑制性神经递质,通过调整平滑肌活动而使LES松弛,应用VIP抗血清可以抑制LES松弛。电刺激离体的LES肌肉可以使LES松

弛并且释放VIP<sup>[13]</sup>。因电刺激或烟碱作用引起的猫LES快速松弛是由NO始动的,而这种松弛缓慢恢复至正常状态主要是由于VIP或类VIP肽的释放<sup>[50]</sup>。贲门失迟缓症是一种神经肌肉紊乱,其特征为对于吞咽的反射,食管体缺乏蠕动LES松弛不能。这种疾病的LES处缺乏VIP神经,而且对于VIP的刺激突触后的受体(D-2DA受体)反应障碍<sup>[51]</sup>。这也支持了VIP作为LES的一种抑制性神经递质而存在。反流性食管炎常伴有LES松弛,研究表明在有炎症反应的食管黏膜神经中含有VIP的神经选择性的增加了约3-4倍<sup>[52]</sup>。

除了VIP外,还有其他神经递质参与LES松弛<sup>[50]</sup>。PHI与VIP由同一前体产生,结构上同源并且存在相同的神经元中。在LES中,VIP和PHI都产生耐-河豚毒素剂量依赖性松弛,而且两者具有相同的强度。经PHI抗血清处理的平滑肌束,LES松弛减少了20%-30%,而且对VIP导致的松弛没有作用。上述说明了PHI可能参与电刺激导致的LES松弛<sup>[13]</sup>。PACAP是一种首先从绵羊下丘脑提发现的新的类VIP肽<sup>[53]</sup>。PACAP前体的后-转译过程中产生了两种生物活性分子PACAP38和PACAP27,其免疫相关神经细胞体及神经纤维也可在猫和人的LES环状平滑肌层中大量发现<sup>[54]</sup>。PACAP对LES的松弛作用不如VIP,他在功能上的作用尚未明确。

与NO不同,这些抑制性的肽刺激cAMP,并增加cAMP的浓度,通过了cAMP而不是cGMP参与了LES松弛的调节。VIP引起的LES松弛与时间依赖性的1, 4, 5-IP<sub>3</sub>减少及cAMP水平增加相关<sup>[13,23,36]</sup>。

**3.6 降钙基因相关肽** CGRP是一种抑制性的神经递质参与了LES的松弛。CGRP在猫的LES主要存在于大的神经束膜中,这种神经束膜从肌内板穿过,并且穿过环肌层,到达黏膜下和黏膜处的神经。CGRP免疫活性和NOS免疫活性定位于介导蠕动性收缩和LES松弛的肠肌丛神经中,并且CGRP与SP在血管神经纤维协同定位分布于食管环肌和LES中<sup>[56]</sup>。CGRP直接作用LES,使其松弛,减少食管蠕动的幅度和延长反应的潜伏期,他对LES的抑制作用比降钙素强300倍,比VIP强400倍。外源性CGRP的作用可被CGRP拮抗剂CGRP8-37所抑制,表现为“关闭”收缩反应幅度增加及潜伏期缩短,且LES基础压力增加。CGRP8-37不会抑制LES的松弛及食管的收缩。N-硝基L-精氨酸不能消除CGRP产生的松弛。CGRP-LI神经穿过食管肌肉黏膜层并且也穿过

鳞状上皮到达食管腔,提示了CGRP可能起了感觉功能作用<sup>[56]</sup>。

**3.7 促生长激素神经肽** GAL免疫相关神经纤维和神经元存在食管括约肌的肠肌层和黏膜下丛。GAL使LES基础张力增加并减弱NANC神经介导的松弛<sup>[57]</sup>。GAL对括约肌基础张力的影响常常通过直接作用于肌细胞而完成的,其内在机制尚未阐明。研究表明,GAL可引起LESP浓度依赖性上升,且不被阿托品拮抗,并可使LES上1-5 cm处收缩潜伏期缩短<sup>[57]</sup>。而Lichtenslein *et al*<sup>[58]</sup>报道,GAL对基础状态下的LES无作用,但可抑制由直接或间接收缩剂引起的收缩,而对VIP引起的LES松弛无作用,纳洛酮可逆转GAL的作用。

**3.8 生长激素抑制素** 生长激素抑制素(somatostatin, SS)可以通过抑制肌间胆碱能神经元释放ACh,从而增加抑制性神经元的活动。SS能选择性抑制LES中的兴奋性神经元、VIP,而不是抑制基础LESP。SS已经被证实能阻止人进食引起的TLESR<sup>[59]</sup>。SS类似物奥曲肽(octreotide)能增加LES基础压力,但目前还没有确切的相关报道<sup>[60]</sup>。

**3.9 Cajal间质细胞** 食管下端存在着一种特殊的间质细胞壁内的Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC),免疫组织化学染色和电镜研究发现,ICC与神经元细胞的关系十分密切,无论与兴奋性还是抑制性神经元(包括:胆碱能、NO、VIP、SP等)有密切联系,从而参与神经信号的传递。同时还发现,这些类型的ICC与平滑肌特别是环形肌细胞的接触也较紧密,说明神经元信号传至ICC后,再作用于平滑肌细胞的通路存在结构基础<sup>[61]</sup>。

在食管远端,ICC存在于环形肌和纵形肌内;而在黏膜下丛未发现ICC。贲门失弛缓症患者中的LES高压和损害性松弛时可看到硝基能神经通路的功能失调,LES处ICC数目减少或缺如,特别是晚期患者很难看到ICC,ICC与神经末梢膨胀体的密切接触消失,ICC内线粒体减少,很少看见滑面内质网<sup>[62-63]</sup>。

ICC在神经传递中的作用并不十分明确。有人对缺乏ICC的W/W<sup>v</sup>小鼠研究发现,尽管NOS阳性神经元和神经纤维均正常,由于ICC缺乏,LES对外源性NO刺激的反应消失<sup>[64]</sup>。研究还注意到ICC内有NOS阳性产物表达,推测其意义可能为:(1)神经冲动传至ICC后可促其产生NO,作用于平滑肌细胞,产生松弛效应。(2)ICC内NOS产生NO后,使细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度增加,将抑制性神经信号放大。(3)神经末梢释放递质作用于ICC,

控制NO产生,从而控制神经信号输入<sup>[65]</sup>。ICC在兴奋性神经元信号传递中也有作用,肠运动神经元释放的ACh与ICC结合,通过ICC与平滑肌细胞的缝隙连接,产生兴奋性连接电位(excitatory junction potential, EJP)。使平滑肌细胞产生去极化。ICC缺如的平滑肌对电神经刺激(通过ACh释放产生EJP)的反应明显减弱。依据从上述研究提出的观点:神经元末梢、IC-IM、平滑肌细胞形成了基本功能单位,包括神经递质释放、介导、传递、最后产生机械效应<sup>[65]</sup>。也有实验表明,nNOS(-/-)小鼠类似于失弛缓症一样存在着LES的高压和损伤性松弛;而缺乏ICC的W/W(v)小鼠LES为低压并无损伤性松弛,从而提出了ICC在硝基能神经传递中并不起主要作用的观点<sup>[66]</sup>。即使W/W(v)小鼠在缺乏ICC的情况下,食管神经-肌肉仍可完成收缩运动,可能通过神经递质作用于平滑肌细胞来实现这一过程的;而ICC的缺乏,可能与食管下端括约肌基础压力升高及增加食管自主性运动相关<sup>[67]</sup>。

## 4 结论

食管神经支配由中枢神经系统、周围神经系统及肠神经系统三方面组成,共同作用调控了食管的功能。而肠神经系统中的各类神经及其递质的关系复杂,一直是多年来研究的热点。还有很多研究较少的食管内存在的神经元及神经递质,本文未加以一一阐述,例如神经降压肽、蛙皮素、促皮质激素释放激素受体1免疫阳性神经元、钙视网膜蛋白等,其机制及作用有待进一步深入研究。随着食管肠神经系统的基础研究不断进展,将为更好的解决临床食管动力性疾病提供了理论基础和实验依据。

## 5 参考文献

- 1 Sarna SK, Daniel EE, Waterfall WE. Myogenic and neural control systems for esophageal motility. *Gastroenterology* 1977; 73: 1345-1352
- 2 Wood JD, Alpers DH, Andrews PL. Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 1999; 45 Suppl 2: II6-II16
- 3 Fryszak T, Zenker W, Kantner D. Afferent and efferent innervation of the rat esophagus. A tracing study with horseradish peroxidase and nuclear yellow. *Anat Embryol (Berl)* 1984; 170: 63-70
- 4 Barone FC, Lombardi DM, Ormsbee HS 3rd. Effects of hindbrain stimulation on lower esophageal sphincter pressure in the cat. *Am J Physiol* 1984; 247: G70-G78
- 5 Neuhuber WL, Eichhorn U, Wörl J. Enteric co-innervation of striated muscle fibers in the esophagus: just a "hangover"? *Anat Rec* 2001; 262: 41-46
- 6 Kuramoto H, Kawano H, Sakamoto H, Furness



- JB. Motor innervation by enteric nerve fibers containing both nitric oxide synthase and galanin immunoreactivities in the striated muscle of the rat esophagus. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 241-245
- 7 Neuhuber WL, Wörl J, Berthoud HR, Conte B. NADPH-diaphorase-positive nerve fibers associated with motor endplates in the rat esophagus: new evidence for co-innervation of striated muscle by enteric neurons. *Cell Tissue Res* 1994; 276: 23-30
  - 8 Mizuguchi S, Ohno T, Hattori Y, Kamata K, Arai K, Saeki T, Saigenji K, Hayashi I, Kuribayashi Y, Majima M. Calcitonin gene-related peptide released by capsaicin suppresses myoelectrical activity of gastric smooth muscle. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 611-618
  - 9 Huang SC. Functional CCK-A and Y2 receptors in guinea pig esophagus. *Regul Pept* 2000; 88: 55-60
  - 10 Singaram C, Sengupta A, Stevens C, Spechler SJ, Goyal RK. Localization of calcitonin gene-related peptide in human esophageal Langerhans cells. *Gastroenterology* 1991; 100: 560-563
  - 11 Storr M, Geisler F, Neuhuber WL, Schusdziarra V, Allescher HD. Characterization of vagal input to the rat esophageal muscle. *Auton Neurosci* 2001; 91: 1-9
  - 12 Breuer C, Neuhuber WL, Wörl J. Development of neuromuscular junctions in the mouse esophagus: morphology suggests a role for enteric coinnervation during maturation of vagal myoneural contacts. *J Comp Neurol* 2004; 475: 47-69
  - 13 Park SY, Youm JH, Jung KC, Sohn UD. Inhibitory effect of hypochlorous acid on lower esophageal sphincter tone relaxation by vasoactive intestinal peptide. *Arch Pharm Res* 2008; 31: 1552-1558
  - 14 Christensen J, Fang S, Rick GA. NADPH-diaphorase-positive nerve fibers in smooth muscle layers of opossum esophagus: gradients in density. *J Auton Nerv Syst* 1995; 52: 99-105
  - 15 Fang S, Christensen J. Distribution of NADPH diaphorase in intramural plexuses of cat and opossum esophagus. *J Auton Nerv Syst* 1994; 46: 123-133
  - 16 Richards WG, Stamler JS, Kobzik L, Sugarbaker DJ. Role of nitric oxide in human esophageal circular smooth muscle in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110: 157-164
  - 17 Sifrim D, Lefebvre R. Role of nitric oxide during swallow-induced esophageal shortening in cats. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 822-830
  - 18 Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M, Conklin JL. The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor functions in humans. *Gastroenterology* 1995; 109: 1241-1248
  - 19 Thomas RM, Fang S, Leichus LS, Oberley LW, Christensen J, Murray JA, Ledlow A, Conklin JL. Antioxidant enzymes in intramural nerves of the opossum esophagus. *Am J Physiol* 1996; 270: G136-G142
  - 20 Naya MJ, Pereboom D, Ortego J, Alda JO, Lanas A. Superoxide anions produced by inflammatory cells play an important part in the pathogenesis of acid and pepsin induced oesophagitis in rabbits. *Gut* 1997; 40: 175-181
  - 21 Leichus LS, Thomas RM, Murray JA, Conklin JL. Effects of oxygen radicals and radical scavenging on opossum lower esophageal sphincter. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 592-596
  - 22 Krysiak PS, Preiksaitis HG. Tachykinins contribute to nerve-mediated contractions in the human esophagus. *Gastroenterology* 2001; 120: 39-48
  - 23 Farré R, Sifrim D. Regulation of basal tone, relaxation and contraction of the lower oesophageal sphincter. Relevance to drug discovery for oesophageal disorders. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 858-869
  - 24 Korsapati H, Babaei A, Bhargava V, Mittal RK. Cholinergic stimulation induces asynchrony between the circular and longitudinal muscle contraction during esophageal peristalsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G694-G698
  - 25 Tian ZQ, Liu JF, Wang GY, Li BQ, Wang FS, Wang QZ, Cao FM, Zhang YF. Responses of human clasp and sling fibers to neuromimetics. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 440-447
  - 26 Muinuddin A, Naqvi K, Sheu L, Gaisano HY, Diamant NE. Regional differences in cholinergic regulation of potassium current in feline esophageal circular smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1233-G1240
  - 27 James AN, Ryan JP, Crowell MD, Parkman HP. Regional gastric contractility alterations in a diabetic gastroparesis mouse model: effects of cholinergic and serotonergic stimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G612-G619
  - 28 Preiksaitis HG, Krysiak PS, Chrones T, Rajgopal V, Laurier LG. Pharmacological and molecular characterization of muscarinic receptor subtypes in human esophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 879-888
  - 29 Woolley ML, Carter HJ, Gartlon JE, Watson JM, Dawson LA. Attenuation of amphetamine-induced activity by the non-selective muscarinic receptor agonist, xanomeline, is absent in muscarinic M4 receptor knockout mice and attenuated in muscarinic M1 receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 2009; 603: 147-149
  - 30 刘洪瑞, 郭政东, 韩雪松, 王海波, 李智. 应用m<sub>5</sub>A ChR-G<sub>11α</sub>融合蛋白鉴别M<sub>5</sub>受体亚型的特异性药物. *中国药理学通报* 2006; 22: 917-921
  - 31 Kang HY, Lee TS, Lee YP, Lee DW, La HO, Song HJ, Sohn UD. Interaction of calmodulin- and PKC-dependent contractile pathways in cat lower esophageal sphincter (LES). *Arch Pharm Res* 2001; 24: 546-551
  - 32 Tsumori T, Ando A, Domoto T, Oki M, Nakamura T. Coexistence of vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y immunoreactivity within axon terminals in the canine and human lower esophageal sphincter: electron microscopy by a double immunogold labeling procedure. *Acta Anat (Basel)* 1994; 149: 272-278
  - 33 Mosley RG, Reichelderfer M, Sengupta A, Singaram C. Innervation of an esophageal ectatic submucosal blood vessel in achalasia and a comparison with normals. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1874-1879
  - 34 Kressel M, Radespiel-Tröger M. Anterograde tracing and immunohistochemical characterization of potentially mechanosensitive vagal afferents in the esophagus. *J Comp Neurol* 1999; 412: 161-172
  - 35 Jensen SL, Aggestrup S, Fahrenkrug J, Schaffalitzky de Muckadell OB, Sánchez Almeyra R. [Electric stimulation of the autonomic nervous system and vasoactive intestinal peptide and substance P release on the lower esophageal sphincter] *Acta*

- Gastroenterol Latinoam* 1990; 20: 131-136
- 36 Imaeda K, Cunnane TC. Electrophysiological properties of inhibitory junction potential in murine lower oesophageal sphincter. *J Smooth Muscle Res* 2003; 39: 119-133
  - 37 Rodrigo J, Uttenthal LO, Peinado MA, Esteban FJ, Fernández AP, Serrano J, Martínez de Velasco J, Santacana M, Bentura ML, Martínez-Murillo R, Pedrosa JA. Distribution of nitric oxide synthase in the esophagus of the cat and monkey. *J Auton Nerv Syst* 1998; 70: 164-179
  - 38 Konturek JW, Thor P, Lukaszyk A, Gabryelewicz A, Konturek SJ, Domschke W. Endogenous nitric oxide in the control of esophageal motility in humans. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 201-209
  - 39 Sidhu AS, Triadafilopoulos G. Neuro-regulation of lower esophageal sphincter function as treatment for gastroesophageal reflux disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 985-990
  - 40 Fan YP, Chakder S, Gao F, Rattan S. Inducible and neuronal nitric oxide synthase involvement in lipopolysaccharide-induced sphincteric dysfunction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G32-G42
  - 41 L'Heureux MC, Muinuddin A, Gaisano HY, Diamant NE. Feline lower esophageal sphincter sling and circular muscles have different functional inhibitory neuronal responses. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G23-G29
  - 42 Nakao A, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, Billiar TR, McCurry KR. Application of heme oxygenase-1, carbon monoxide and biliverdin for the prevention of intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 42: 78-88
  - 43 Pachori AS, Smith A, McDonald P, Zhang L, Dzau VJ, Melo LG. Heme-oxygenase-1-induced protection against hypoxia/reoxygenation is dependent on biliverdin reductase and its interaction with PI3K/Akt pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43: 580-592
  - 44 Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, Chung HT. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 2004; 172: 4744-4751
  - 45 Xue L, Farrugia G, Miller SM, Ferris CD, Snyder SH, Szurszewski JH. Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1851-1855
  - 46 Guo JS, Cho CH, Wang WP, Shen XZ, Cheng CL, Koo MW. Expression and activities of three inducible enzymes in the healing of gastric ulcers in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1767-1771
  - 47 Tamion F, Richard V, Renet S, Thuilleux C. Protective effects of heme-oxygenase expression against endotoxic shock: inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  and augmentation of interleukin-10. *J Trauma* 2006; 61: 1078-1084
  - 48 姜柳琴, 林琳. 血红素加氧酶/一氧化碳体系在胃肠道的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1612-1616
  - 49 Inoue K, Takahashi T, Uehara K, Shimizu H, Ido K, Morimatsu H, Omori E, Katayama H, Akagi R, Morita K. Protective role of heme oxygenase 1 in the intestinal tissue injury in hemorrhagic shock in rats. *Shock* 2008; 29: 252-261
  - 50 Park SY, Youm JH, Jung KC, Sohn UD. Inhibitory effect of hypochlorous acid on lower esophageal sphincter tone relaxation by vasoactive intestinal peptide. *Arch Pharm Res* 2008; 31: 1552-1558
  - 51 Shin CY, Lee YP, Song HJ, Je HD, Sohn UD. Cyclic AMP dependent down regulation in the relaxation of smooth muscle cells of cat esophagitis. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 715-722
  - 52 Kim SH, Youm JH, Lee DK, Park SY, Shin CY, Ryu JS, La HO, Song HJ, Min YS, Sohn UD. Effect of hydrogen peroxide on VIP-induced relaxation of the cat lower esophageal sphincter. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 1419-1425
  - 53 Newton M, Kamm MA, Soediono PO, Milner P, Burnham WR, Burnstock G. Oesophageal epithelial innervation in health and reflux oesophagitis. *Gut* 1999; 44: 317-322
  - 54 Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 269-324
  - 55 Gonzalez BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A, Vaudry H. [Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide] *Ann Endocrinol (Paris)* 1998; 59: 364-405
  - 56 Uc A, Murray JA, Conklin JL. Effects of calcitonin gene-related peptide on opossum esophageal smooth muscle. *Gastroenterology* 1997; 113: 514-520
  - 57 Rattan S, Tamura W. Role of galanin in the gastrointestinal sphincters. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 863: 143-155
  - 58 Lichtenstein GR, Reynolds JC, Ogorek CP, Parkman HP. Localization and inhibitory actions of galanin at the feline lower esophageal sphincter. *Regul Pept* 1994; 50: 213-222
  - 59 Straathof JW, Tieleman S, Lamers CB, Masclee AA. Effect of somatostatin on lower esophageal sphincter characteristics in man. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 910-915
  - 60 Holloway RH. Systemic pharmacomodulation of transient lower esophageal sphincter relaxations. *Am J Med* 2001; 111 Suppl 8A: 178S-185S
  - 61 Brooks JC, Zambreanu L, Godinez A, Craig AD, Tracey I. Somatotopic organisation of the human insula to painful heat studied with high resolution functional imaging. *Neuroimage* 2005; 27: 201-209
  - 62 Kilic A, Luketich JD, Landreneau RJ, Owens SR, Krasinskas AM, Schuchert MJ. Alterations in the density of interstitial cells of Cajal in achalasia. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 1488-1492
  - 63 Gockel I, Bohl JR, Eckardt VF, Junginger T. Reduction of interstitial cells of Cajal (ICC) associated with neuronal nitric oxide synthase (n-NOS) in patients with achalasia. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 856-864
  - 64 Vannucchi MG. Receptors in interstitial cells of Cajal: identification and possible physiological roles. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 325-335
  - 65 Wang XY, Sanders KM, Ward SM. Intimate relationship between interstitial cells of cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* 1999; 295: 247-256
  - 66 Huizinga JD, Reed DE, Berezin I, Wang XY, Valdez DT, Liu LW, Diamant NE. Survival dependency of intramuscular ICC on vagal afferent nerves in the cat esophagus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: R302-R310
  - 67 Farré R, Wang XY, Vidal E, Doménech A, Pumarola M, Clave P, Huizinga JD, Jiménez M. Interstitial cells of Cajal and neuromuscular transmission in the rat lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 484-496

# 钙结合蛋白S100A4与消化系肿瘤研究进展

李宾, 田相国, 秦成勇

李宾, 田相国, 秦成勇, 山东大学附属省立医院消化内科 山东省济南市 250021

作者贡献分布: 本综述由李宾与田相国书写完成, 秦成勇审校.  
通讯作者: 秦成勇, 250021, 山东省济南市, 山东大学附属省立医院消化内科. thin2002@163.com

电话: 0531-85186350

收稿日期: 2008-11-04 修回日期: 2009-02-16

接受日期: 2009-02-19 在线出版日期: 2009-03-18

## Advances in calcium-binding protein S100A4 and digestive neoplasms

Bin Li, Xiang-Guo Tian, Cheng-Yong Qin

Bin Li, Xiang-Guo Tian, Cheng-Yong Qin, Department of Digestive Diseases, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China  
Correspondence to: Cheng-Yong Qin, Department of Digestive Diseases, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China. thin2002@163.com

Received: 2008-11-04 Revised: 2009-02-16

Accepted: 2009-02-19 Published online: 2009-03-18

### Abstract

S100A4 protein, encoded by S100A4 gene, is a kind of calcium-binding regulatory proteins. Combining with the calcium ions, this protein plays an important role in the progress of tumor growth and metastasis. Recent investigations concluded that there is a relationship between S100A4 protein and tumor invasion or metastasis. This article reviews the biochemical property of this protein and summarizes its action and potential mechanism in digestive tumor progression and metastasis.

**Key Words:** S100A4 protein; Digestive tumor; Tumor metastasis

Li B, Tian XG, Qin CY. Advances in calcium-binding protein S100A4 and digestive neoplasms. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(8): 805-808

### 摘要

S100A4基因编码的钙离子结合调节蛋白-S100A4蛋白, 通过与钙离子结合, 在许多肿瘤发展、转移过程中发挥重要作用。目前研究

认为其与肿瘤的浸润和转移密切相关。本文就S100A4生物学特性及其在消化系肿瘤中作用及可能机制的研究进展作一综述。

**关键词:** S100A4; 消化系肿瘤; 肿瘤转移

李宾, 田相国, 秦成勇. 钙结合蛋白S100A4与消化系肿瘤研究进展. 世界华人消化杂志. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 805-808

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/805.asp>

### 0 引言

S100蛋白最先是Moore从牛脑中分离出的一组钙离子结合调节蛋白, 因能溶于100%的硫酸铵溶液而被称为S100蛋白<sup>[1]</sup>. S100A4蛋白是S100家族成员之一, 主要来源于上皮细胞和肿瘤细胞, 他在体内具有多种生物学功能。目前研究的热点多聚焦在其与肿瘤浸润、转移的关系及其机制。

### 1 S100A4蛋白的生物学特性

根据克隆来源不同, S100A4基因曾被称为Mts1(metastasin)、FSP1(fibroblast-specific protein)、18A2、pEL98、p9Ka、42A、CAPL、calvasculi等。人类S100A4基因定位于稳定性差的1号染色体长臂2区1带(1q21), 该区域易发生染色体的缺失、易位、重叠等改变, 研究发现S100A4基因与stathmin(Op18)基因表达关系密切, 提示S100A4与肿瘤的发生、发展关系密切<sup>[2]</sup>. 其编码的S100A4蛋白是由101个氨基酸组成的多肽, 分子质量为11.5 kDa. 作为S100蛋白家族中的一员, S100A4具有其家族的共同特性, 比如: 在结构上具有EF双螺旋结构的氨基酸序列(手型钙离子结合区), 当此区与钙离子结合后其构象就发生变化, 暴露出其结合位点, 进而通过与相应靶蛋白的结合发挥其特定的生物学效应, 如在细胞运动、侵袭、细胞分裂、存活中发挥重要作用<sup>[3]</sup>. 在细胞内S100A4蛋白以非共价键二聚体形式存在, 有同型、异型两种构型; 该蛋白与细胞骨架蛋白肌动蛋白、原

### ■背景资料

S100A4蛋白通过促进肿瘤细胞增殖、诱导血管生成、降低细胞黏附力、促进基质降解、增强细胞运动能力, 在肿瘤的发生、发展和侵袭转移中发挥重要作用。深入研究S100A4蛋白与消化系肿瘤的关系, 成为目前国内外学者广泛关注和研究的热点。

### ■同行评议者

郝纯毅, 主任医师, 北京肿瘤医院肿瘤外科; 施瑞华, 教授, 南京医科大学第一附属医院消化科

## ■研发前沿

原发性肝癌因其恶性程度高、转移复发率高、手术切除率低,成为肿瘤治疗中的重点和难点。S100A4蛋白作为与肿瘤侵袭转移密切相关的蛋白,其与肝癌的侵袭转移的关系,目前研究较少,值得进一步深入研究。

肌球蛋白、肌球蛋白和P53蛋白相交联,参与细胞骨架动力学和细胞运动的调节<sup>[4-5]</sup>。在胞外S100A4以蛋白单体及二聚体两种形式存在,二者之间的转换处于动态平衡状态,其比例受钙离子结合程度的影响。S100A4蛋白结构的可变性可能是其在体内发挥多种生物学功能的基础<sup>[6]</sup>。

## 2 S100A4在人类组织、细胞中的分布

S100A4蛋白在人类的单核细胞、巨噬细胞、多形核粒细胞、角化细胞、郎罕氏细胞及汗腺细胞中有或多或少的表达,在正常肺组织、肾脏组织、乳腺、甲状腺、胰腺及结肠的腺体中均无表达<sup>[7]</sup>。在消化系肿瘤方面,有文献报道S100A4在食管鳞癌<sup>[8]</sup>、胃肿瘤<sup>[9-10]</sup>、结直肠癌、胰腺癌、胆囊癌中有不同程度表达。其中Choi *et al*<sup>[11]</sup>应用免疫组化技术分析了124例结直肠癌患者的病理结果(其中有淋巴结转移的病理62例),发现在癌组织中69例(55.6%)S100A4蛋白呈阳性表达,43例(69.4%)有淋巴结转移的病例呈阳性,且S100A4的表达与肿瘤分期及淋巴结转移率密切相关,但与肿瘤的位置、大小形态及患者的生存时间无关;然而Hemandas近期研究认为结直肠癌患者中,S100A4的表达与临床预后成负相关<sup>[12]</sup>,其中表达该蛋白阳性的患者3年生成率为62.85%,而表达阴性者为93.75%。Oida *et al*<sup>[13]</sup>等研究了72例胰腺癌患者的组织病理,发现在肿瘤组织中有40例(56%)表达S100A4蛋白阳性,认为S100A4蛋白的表达与疾病的预后及肿瘤的复发关系密切;Chang *et al*<sup>[14]</sup>检测了138例胆囊癌患者的病理组织,发现有26%左右的癌组织中S100A4蛋白为强阳性表达,认为S100A4蛋白表达阳性的患者生存时间较表达阴性者明显减少。另外国内学者崔杰峰 *et al*<sup>[15]</sup>研究证实在有转移潜能的肝癌细胞系(MHCC97H、MHCC97L)中S100A4蛋白呈高表达。

## ■相关报道

崔杰峰 *et al*研究证实在有转移潜能的肝癌细胞系(MHCC97H、MHCC97L)中S100A4蛋白呈高表达,进一步研究发现S100A4蛋白通过增强肝癌细胞的运动侵袭能力和上调MMP的分泌参与肝癌细胞的侵袭转移过程。

## 3 S100A4蛋白在消化系肿瘤发生、发展、侵袭及转移中的作用及机制

3.1 S100A4蛋白与肿瘤的发生 Lee *et al*<sup>[16]</sup>研究分析了包括Barrett食管(Barrett's esophagus, BE)、Barrett腺癌在内的187例肿瘤,发现在68例Barrett食管组织中有51例过度表达S100A4蛋白,推测在BE及肿瘤分化过程中存在着Ca<sup>2+</sup>平衡的改变,S100A4蛋白过度表达可能在BE癌变过程中发挥着重要作用。目前研究<sup>[17]</sup>发现S100A4可与

P53蛋白C终端的四价功能多肽(tetramerization domain peptide, TET)结合,进而抑制p53四聚体的形成、改变其亚细胞定位、促进野生型p53的丢失、抑制蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)介导的磷酸化反应,进而抑制P53蛋白的活化,以上作用使P53丧失了其在细胞周期中的调控作用及G<sub>1</sub>/S期的检查点功能。因此DNA已发生突变的细胞可以摆脱P53对G<sub>1</sub>/S期调控点的控制,顺利的进入S期,从而为细胞恶变提供了可能。也有研究认为S100A4蛋白与野生型p53蛋白的整合,在细胞恶变早期有协同促进细胞凋亡的作用,但随着野生型P53蛋白功能的逐渐丧失,细胞的恶性征象(如侵袭性、转移性)也随之越来越明显,推测S100A4蛋白在肿瘤发生过程中扮演着重要的角色<sup>[18]</sup>。

3.2 S100A4蛋白与肿瘤血管生成 研究表明<sup>[19]</sup>当肿瘤的直径超过1 mm时,肿瘤组织就需要血管提供营养来维持其生长,否则肿瘤细胞将发生凋亡。因此,血管生成是肿瘤生长的关键。而血管内皮基底膜的降解、内皮细胞向肿瘤组织迁移及在迁移中增殖,是血管生成过程的两个必不可少的环节。Ambartsumian *et al*将S100A4基因转染至鼠的恶性肿瘤细胞,发现转染后,肿瘤组织显微结构中的血管异常丰富<sup>[20]</sup>;并通过进一步研究认为,S100A4蛋白可能是一个促血管发生因子,可通过其自身的特性增强内皮细胞的移动性、减少血管生成抑因子如血小板反应蛋白1的产生,而促进血管的生成<sup>[21]</sup>。也有学者认为,S100A4在促进细胞外基质降解重塑的过程中,可刺激内皮细胞迁移,同时伴随着血管的生成<sup>[22]</sup>。近期研究发现<sup>[23]</sup>,S100A4蛋白可与内皮纤溶酶原复合受体(annexin II)相互作用,促进组织纤溶酶原激活物对纤溶酶原的激活,而活化的纤溶酶可诱导血管生成。S100A4促进血管生成的作用,使这种蛋白成为新的抗癌和抗血管生成疗法的有吸引力的靶点<sup>[24]</sup>。我国学者Ai *et al*通过检测S100A4和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在胰腺癌中的表达情况,发现S100A4和VEGF在胰腺癌中的表达呈正相关,认为二者高表达的患者预后较差,VEGF与S100A4的具体关系需要进一步的研究明确<sup>[25]</sup>。

3.3 S100A4蛋白与肿瘤侵袭、转移 肿瘤转移过程是一个具有内在联系的多个步骤相互作用的结果,最早是Liotta *et al*<sup>[24]</sup>提出的黏附、降解、移动学说,每个步骤也是有多个因素的共同参



与, 具有其复杂性. 钙结合蛋白S100A4在肿瘤侵袭、转移中起着不可替代的作用, 这也是人们称其为转移相关蛋白的原因所在. 其作用总结如下:

**3.3.1 降低肿瘤细胞间的黏附力:** 肿瘤细胞发生远处转移, 必须先从原发灶的黏附部位脱离, 这就要克服由黏附分子介导的细胞间黏附力. 上皮钙黏蛋白(E-cadherin)是一种细胞黏附分子, 参与钙离子依赖性细胞黏附力的调节而维持正常细胞间的黏附, 进而抑制细胞的侵袭性<sup>[26]</sup>. Ikoma *et al*<sup>[27]</sup>研究发现, 在高转移肿瘤细胞株中S100A4高表达而钙黏着蛋白低表达, 且二者的表达呈负相关. Chang *et al*<sup>[14]</sup>检测了138例胆囊癌患者的病理组织, 发现S100A4蛋白表达阳性, 而上皮钙黏蛋白表达丢失的患者生存时间明显缩短. 国内学者通过研究168例胰腺癌的病理组织, 认为S100A4蛋白的高表达, 上皮钙黏蛋白的异常表达与胰腺癌淋巴结转移和浸润转移关系密切<sup>[28]</sup>. 另一种与之相关的细胞黏附分子是CD44, 又称归巢蛋白, 他是一类分布极为广泛的细胞表面跨膜糖蛋白, 参与细胞间、细胞与基质间相互作用. 该蛋白能与细胞骨架蛋白结合, 参与细胞伪足形成, 并与细胞的迁移运动有关. 有研究认为<sup>[29]</sup>S100A4蛋白对细胞骨架结构的作用可引起CD44的重新分布, 使细胞表面的CD44表达增加, 进而有利于肿瘤细胞的转移.

**3.3.2 促进细胞外基质降解和重塑:** 在肿瘤细胞的浸润和转移过程中会遇到一系列的组织屏障, 肿瘤细胞发生远处转移除了要克服细胞间的黏附力之外, 还要通过各种途径降解细胞外基质, 为自身移动建立通道. 肿瘤细胞侵袭过程一般伴随着多种蛋白酶的改变, MMP可降解细胞外基质, 在肿瘤细胞的侵袭转移中发挥重要作用, 是研究的热点之一. Gao *et al*<sup>[30]</sup>发现转染反义S100A4基因的肿瘤细胞, 其MMP2表达明显下降, 进而推测S100A4可通过上调MMP2的表达而为肿瘤细胞的转移清除障碍. 国内学者研究推测, S100A4在肝癌细胞侵袭转移中发挥作用的途径之一即为上调MMP的表达分泌<sup>[15]</sup>. 也有学者研究<sup>[22]</sup>认为, 位于细胞外的S100A4蛋白同样能够促进MMP的合成, 导致细胞外基质的降解及重塑, 在此过程中更有利于肿瘤细胞的转移.

**3.3.3 增加肿瘤细胞运动能力:** 肿瘤细胞之间、肿瘤与细胞外基质间的黏附力降低, 细胞外基质的降解和重建是肿瘤细胞发生转移的外界条件, 而肿瘤细胞的运动性增强是肿瘤发生转移

的内部因素, 也是发生转移的必要前提. Zhang *et al*<sup>[31]</sup>利用荧光寿命成像显微技术第一次在哺乳动物活细胞内发现, S100A4蛋白可与非骨骼肌肌球蛋白重链及原肌球蛋白直接发生相互作用, 并推测此作用是促进肿瘤转移的重要机制之一. 近期研究发现S100A4蛋白可以与肌球蛋白-IIA直接作用, 通过影响肿瘤细胞极化, 调节肿瘤细胞运动<sup>[32]</sup>. 这种作用一方面可抑制由钙离子依赖性的, PKC介导的肌球蛋白重链的磷酸化而阻碍其聚集<sup>[33]</sup>; 另一方面可增加肌球蛋白的可溶性而抑制其整合, 同时还可使肌动蛋白细丝失控<sup>[34]</sup>. 通过以上途径, S100A4蛋白的过度表达, 导致细胞骨架结构的改变, 从而增加肿瘤细胞的运动能力.

## 4 结论

S100A4蛋白在消化系肿瘤发生发展、浸润和转移过程中发挥着重要的作用. 尤其在消化系肿瘤转移过程中, 虽然许多学者对该蛋白的阳性表达与肿瘤大小、分型、分期之间的关系存在一定的争议, 但是均研究发现, 蛋白的过度表达与术后肿瘤复发以及患者的生存期呈明显的负相关. 该蛋白能否作为判断消化系肿瘤患者手术后预后的指标, 另外能否针对该蛋白做相应的靶治疗, 仍需要进一步研究明确.

## 5 参考文献

- 1 Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965; 19: 739-744
- 2 Sherbet GV, Lakshmi MS. S100A4 (MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res* 1998; 18: 2415-2421
- 3 Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 637-668
- 4 Gongoll S, Peters G, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Kreipe H, von Wasielewski R. Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2002; 123: 1478-1484
- 5 Mazzucchelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol* 2002; 160: 7-13
- 6 Tarabykina S, Scott DJ, Herzyk P, Hill TJ, Tame JR, Kriajevska M, Lafitte D, Derrick PJ, Dodson GG, Maitland NJ, Lukanidin EM, Bronstein IB. The dimerization interface of the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1): in vivo and in vitro studies. *J Biol Chem* 2001; 276: 24212-24222
- 7 Gribenko AV, Hopper JE, Makhatadze GI. Molecular characterization and tissue distribution of a novel member of the S100 family of EF-hand proteins. *Biochemistry* 2001; 40: 15538-15548
- 8 Ninomiya I, Ohta T, Fushida S, Endo Y, Hashimoto

## ■创新盘点

本文分析了在肿瘤的发生到发展乃至侵袭转移各个环节中, 目前研究发现的S100A4蛋白所起的作用以及其分子机制, 重点探讨了S100A4蛋白促进消化系肿瘤的侵袭转移的分子机制.

## ■同行评价

本文内容丰富, 语言流畅, 参考文献引用合理, 具有较好的可读性。

- 9 Yonemura Y, Endou Y, Kimura K, Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, Kinoshita K, Ninomiya I, Sugiyama K, Heizmann CW, Schafer BW, Sasaki T. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4234-4242
- 10 于观贞, 王杰军, 陈颖, 倪灿荣, 朱明华. 转移相关基因nm23和P53及S100A4在晚期胃癌中的表达及与侵袭转移的相关性研究. *中华胃肠外科杂志* 2006; 9: 165-169
- 11 Cho YG, Kim CJ, Nam SW, Yoon SH, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Overexpression of S100A4 is closely associated with progression of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4852-4856
- 12 Hemandas AK, Salto-Tellez M, Maricar SH, Leong AF, Leow CK. Metastasis-associated protein S100A4—a potential prognostic marker for colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2006; 93: 498-503
- 13 Oida Y, Yamazaki H, Tobita K, Mukai M, Ohtani Y, Miyazaki N, Abe Y, Imaizumi T, Makuuchi H, Ueyama Y, Nakamura M. Increased S100A4 expression combined with decreased E-cadherin expression predicts a poor outcome of patients with pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2006; 16: 457-463
- 14 Chang HJ, Yoo BC, Kim SW, Lee BL, Kim WH. Significance of PML and p53 protein as molecular prognostic markers of gallbladder carcinomas. *Pathol Oncol Res* 2007; 13: 326-335
- 15 Cui JF, Liu YK, Pan BS, Song HY, Zhang Y, Sun RX, Chen J, Feng JT, Tang ZY, Yu YL, Shen HL, Yang PY. Differential proteomic analysis of human hepatocellular carcinoma cell line metastasis-associated proteins. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 615-622
- 16 Lee OJ, Hong SM, Razvi MH, Peng D, Powell SM, Smoklin M, Moskaluk CA, El-Rifai W. Expression of calcium-binding proteins S100A2 and S100A4 in Barrett's adenocarcinomas. *Neoplasia* 2006; 8: 843-850
- 17 Fernandez-Fernandez MR, Veprintsev DB, Fersht AR. Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 4735-4740
- 18 Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* 2001; 276: 22699-22708
- 19 Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 1994; 79: 185-188
- 20 Ambartsumian N, Klingelhofer J, Grigorian M, Christensen C, Kriajevska M, Tulchinsky E, Georgiev G, Berezin V, Bock E, Rygaard J, Cao R, Cao Y, Lukanidin E. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene* 2001; 20: 4685-4695
- 21 Ambartsumian N, Grigorian M, Lukanidin E. Genetically modified mouse models to study the role of metastasis-promoting S100A4(mts1) protein in metastatic mammary cancer. *J Dairy Res* 2005; 72 Spec No: 27-33
- 22 Schmidt-Hansen B, Ornås D, Grigorian M, Klingelhöfer J, Tulchinsky E, Lukanidin E, Ambartsumian N. Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 2004; 23: 5487-5495
- 23 Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V. Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem* 2005; 280: 20833-20841
- 24 Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991; 51: 5054s-5059s
- 25 Ai KX, Lu LY, Huang XY, Chen W, Zhang HZ. Prognostic significance of S100A4 and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1931-1935
- 26 Chan AO. E-cadherin in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 199-203
- 27 Ikoma N, Yamazaki H, Abe Y, Oida Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Matsumoto H, Matsuyama T, Ohta Y, Ozawa A, Ueyama Y, Nakamura M. S100A4 expression with reduced E-cadherin expression predicts distant metastasis of human malignant melanoma cell lines in the NOD/SCID/gammaCnull (NOG) mouse model. *Oncol Rep* 2005; 14: 633-637
- 28 李春生, 倪灿荣. S100A4和E-Cadherin在胰腺癌组织中的表达及相关性研究. *临床肝胆病杂志* 2006; 22: 207-208
- 29 Lakshmi MS, Parker C, Sherbet GV. Expression of the transmembrane glycoprotein CD44 and metastasis associated 18A2/MTS1 gene in B16 murine melanoma cells. *Anticancer Res* 1997; 17: 3451-3455
- 30 Gao XN, Tang SQ, Zhang XF. S100A4 antisense oligodeoxynucleotide suppresses invasive potential of neuroblastoma cells. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 648-652
- 31 Zhang S, Wang G, Fernig DG, Rudland PS, Webb SE, Barraclough R, Martin-Fernandez M. Interaction of metastasis-inducing S100A4 protein in vivo by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Eur Biophys J* 2005; 34: 19-27
- 32 Li ZH, Bresnick AR. The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. *Cancer Res* 2006; 66: 5173-5180
- 33 Dulyaninova NG, Malashkevich VN, Almo SC, Bresnick AR. Regulation of myosin-IIA assembly and Mts1 binding by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry* 2005; 44: 6867-6876
- 34 Li ZH, Spektor A, Varlamova O, Bresnick AR. Mts1 regulates the assembly of nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry* 2003; 42: 14258-14266

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

# 经皮经肝肝内门体分流术后肝性脑病发病机制及其预防

刘 锋, 张春清

## ■背景资料

食管胃底静脉曲张出血和顽固性腹水是肝硬化失代偿期严重并发症,传统的内科保守治疗远期效果差,外科切脾+断流或者外科分流,创伤性大,而且对患者肝功储备等一般情况要求较高,且外科分流分流口径难于控制往往会造成反复肝性脑病。TIPS应用后,由于操作简便、安全、创伤小,曾备受临床重视,但TIPS后支架狭窄和术后肝性脑病的问题始终困扰着TIPS的发展。

刘锋, 张春清, 山东大学附属省立医院消化科 山东省济南市 250021

作者贡献分布: 刘锋整理文献, 写作论文, 张春清进行审校。  
通讯作者: 张春清, 250021, 山东省济南市, 山东大学附属省立医院消化科. zhchqing@medmail.com.cn

电话: 0531-86701339

收稿日期: 2009-01-01 修回日期: 2009-01-22

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-18

## Pathogenesis of hepatic encephalopathy and its prevention after transjugular intrahepatic portosystemic shunt

Feng Liu, Chun-Qing Zhang

Feng Liu, Chun-Qing Zhang, Department of Gastroenterology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China

Correspondence to: Chun-Qing Zhang, Department of Gastroenterology, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China. zhchqing@medmail.com.cn

Received: 2009-01-01 Revised: 2009-01-22

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-18

## Abstract

With the increasing use of transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS), we have obtained a breakout progress in the therapy of acute esophageal and gastric-fundus variceal bleeding and refractory ascites. whereas the patency of stent and hepatic encephalopathy (or namely portal-systemic encephalopathy, PSE) after TIPS become two great problems for TIPS. The patency of stent has been improved greatly after the use of covered stent such as Viator stents or covered vascular stents. But the problem of hepatic encephalopathy has not been well solved. In this review, we try to explore the pathogenesis of hepatic encephalopathy and its prevention after TIPS.

**Key Words:** Transjugular intrahepatic portosystemic shunt; Hepatic encephalopathy; Portal systemic encephalopathy

Liu F, Zhang CQ. Pathogenesis of hepatic encephalopathy and its prevention after transjugular intrahepatic

portosystemic shunt. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 798-804

## 摘要

随着经皮经肝肝内门体分流技术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)的不断应用,其在食管胃底静脉曲张破裂出血和顽固性腹水的治疗方面,取得了突破性进展。然而, TIPS术后支架的狭窄闭塞和反复高发的肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)或称为分流性脑病(portal-systemic encephalopathy, PSE)成为困扰TIPS技术发展的两大难题,前者在近期带膜(血管)支架的大量应用后,得到极大的改善;后者始终未得到根本的解决,我们参阅了国内外的最新资料,在此进一步阐述TIPS术后另一难题-肝性脑病的发生情况。

**关键词:** 经皮经肝肝内门体分流; 肝性脑病; 分流性脑病

刘锋, 张春清. 经皮经肝肝内门体分流术后肝性脑病发病机制及其预防. *世界华人消化杂志* 2009; 17(8): 798-804

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/798.asp>

## 0 引言

肝硬化是各种慢性肝病(病毒性肝炎、酒精性肝病、自身免疫性肝病等)的终末阶段,尤其在肝硬化失代偿期。由于肝脏被持续性破坏,肝脏假小叶形成,使门脉回流障碍而引起门脉高压,侧枝循环的形成,此时往往并发上消化道出血、腹水等并发症。对于首次发作的上消化道出血、腹水情况保守的内科治疗一般能起到效果。但是伴随着疾病的进展,肝硬化后上消化道出血、腹水的发生很可能越来越频繁,达到1年发生3-5次上消化道出血或腹水内科保守治疗后无效、对症放腹水后很快重复出现(2-5 d),此时如继续内科保守治疗不仅花费大,而且治疗效果差且患者因并发症而死亡的可能增大。过去TIPS治疗前外科处理不仅患者创伤大、对患者肝功储备要求高,而且术后肝性脑病发生极高并且门脉血栓高发严重影响患者肝移植的手术,

## ■同行评议者

张吉翔, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科; 李靖, 副教授, 中国人民解放军第三军医大学新桥医院肝胆外科

从而广受争议.自TIPS应用后,由于其创伤小、治疗效果明显,基本替代外科手术治疗门脉高压及其并发症,并且为患者活体肝移植提供了等待机会,曾备受临床重视,但TIPS后支架狭窄和术后肝性脑病的问题始终困扰着TIPS的发展,而近年来覆膜支架应用后远期通畅率得到极大的改善,被誉为“TIPS第二个春天来临”,随着TIPS应用的不断增加,使TIPS后肝性脑病的控制摆在了一个更加突出的位置.

## 1 经皮经肝肝内门体分流

经皮经肝肝内门体分流(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)由Rosch于1969年首先进行动物实验研究.1989年Richter首次用于临床,特别是20世纪90年代初,自膨式支架问世后,其临床应用不断增多.TIPS指穿刺颈内静脉成功后,通过导丝、导管、穿刺针的配合,在肝内建立肝静脉和门脉的分流通路,通过降低门脉压力,而达到治疗效果.主要用于治疗门脉高压引起的食管胃底静脉曲张破裂出血(acute variceal bleeding),反复的难于控制的腹水(refractory ascites),肝移植前的等待准备等,术后以支架狭窄和肝性脑病为主的并发症的发生率极高,严重束缚了其应用.因此目前TIPS主要用于内镜治疗无效的急性上消化道出血或肝移植前的术前准备.自TIPS应用开始到大约20世纪末主要应用裸支架,由于TIPS在肝内穿刺后造成的胆道损伤从而引起胆汁漏出,漏出到血管内造成不同程度的黄疸,漏出到支架周围造成不断的炎性刺激从而引起支架的狭窄或闭塞(胆汁漏出学说).据大量的回顾性研究证实,1年狭窄率约为50%-70%,2年狭窄率为80%-100%<sup>[1-3,5,6,8,18-19,23,25,27,33,40,42,44,47,66]</sup>,因此其应用受到极大的束缚.20世纪初始,覆膜血管支架和Viator TIPS专用支架的应用,极大地降低了支架的狭窄率.据目前观察资料研究,覆膜支架的1年狭窄率约为0%-20%,2年狭窄率约为20%-40%<sup>[1-3,7,11,23,25,27,33,39-40,42,44,57]</sup>.有人因此将覆膜支架应用后,支架问题的解决誉为“TIPS治疗的第二个春天的来临”,然而,TIPS术后肝性脑病的问题始终未得到解决<sup>[7,13-14,27-28,58]</sup>,甚至在覆膜支架应用后某种程度的加重肝性脑病的发生.故肝性脑病的解决或许是覆膜支架应用后,影响TIPS治疗的“最后一个寒冬”<sup>[2-3,11,23,25,49-51,55,66,71]</sup>.

## 2 TIPS后分流性脑病的发生机制

TIPS后分流性脑病发生机制,目前认为主要是分流引起或加重的体内含氮物质增多(主要以

血 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 为主)引起的中枢神经系统的功能紊乱.与肝性脑病相同,主要是血氨浓度的增加引起脑内兴奋性和抑制性神经递质的失调,表现为精神的兴奋或抑制.分流性脑病(portal-systemic encephalopathy, PSE)与肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)不同主要表现在分流引起或加重的HE:主要通过(1)直接分流;(2)分流后引起肝脏血流的变化;(3)分流后引起脑血流的改变而起作用,分述如下.

2.1 直接分流 TIPS后肝内建立的门体分流通路,使部分肠道吸收的营养物质及细菌代谢产物未经肝脏解毒而直接进入体循环,进入体内各个器官,进入到脑内.细菌代谢产物导致血脑屏障开放后,从而使肠道吸收的含氮物质更容易进入脑内引起脑功能的紊乱,其对PSE的发生主要与分流口径密切相关,口径的大小某种程度上决定了PSE/HE的发生,口径过大导致分流量的增多,含氮物质的增多,超过中枢神经系统的承受能力,最终引起PSE/HE的发生<sup>[1,10,13-14,16,18,28-29,34,48,59]</sup>.

2.2 分流后肝脏血流的变化 肝脏是一个巨大的代谢器官,对肠道吸收的物质起着解毒作用,其营养物质70%靠门脉供血来提供.门脉血流的减少使肝细胞供血减少,肝细胞受损甚至引起肝脏的缺血坏死,损伤肝功能.因此TIPS后肝脏门脉血流的变化影响着肝脏功能的变化,肝脏功能的改变又某种程度上决定了体内血氨浓度的变化,从而决定了PSE/HE的发生.因此,TIPS术中分流的同时肝脏门脉血流的保护对术后肝性脑病的发生起着主要作用<sup>[15-16,26,41,49,56,60,67,69-70,72]</sup>.

2.3 分流后脑血流的改变 Jalan *et al*<sup>[65]</sup>观察到,TIPS后脑内血流增多,颅内压增加,从而引起脑水肿,加重或引起脑功能的紊乱,而未行TIPS治疗的患者被观察到存在毛细血管阻力的增加,从另一方面解释了TIPS后脑血流量暂时增加后引起脑水肿的机制,即灌流量增加.脑功能的改变还被观察到,在发生反复出血、低钠血症的患者中更容易发生.脑水肿是直接因为TIPS分流引起还是继发于TIPS后肝损伤目前未明<sup>[4,21,45-46,54,61-65,75]</sup>.

总之,TIPS术后发生肝性脑病的机制不明,具体情况,尚待进一步观察研究.目前来看,TIPS后发生的PSE可进一步区别为:PSE I和PSE II,PSE I主要指分流后即发生的PSE,在没有高蛋白进食、感染、电解质紊乱、消化系出血等诱因的情况下发生的PSE,多在术后1 mo内发生,直接与分流口径(或术后肝脏血流动力

### ■研究前沿

随着腹膜支架应用,TIPS在肝硬化治疗中的作用得到进一步体现,然而术后高发肝性脑病的情况更加凸显出来,严重影响着其在治疗中的应用.



## ■相关报道

TIPS后肝性脑病在TIPS应用之初既被大家观察到,也投入不少研究,其中Chung *et al*、Maleux G *et al*在控制支架口径方面、Jacquier *et al*在根据患者术前肝功能方面、Deng *et al*、张家宝 *et al*在观察术前后肝血流方面、Chu *et al*在左右支选择上分别阐述了控制TIPS后肝性脑病或者探讨TIPS后肝性脑病发病机制,使我们大家得到珍贵的研究资料。

学的改变)和术前肝功能相关,常规的内科治疗效果差;PSE II,分流后未产生PSE,主要指在分流的基础上,与体循环大量有毒物质增多相关,分流后在分流的基础上高蛋白进食、感染、电解质紊乱、消化系出血等诱因的情况下发生的PSE,常规的内科治疗效果好。

## 3 影响因素与预防

**3.1 支架口径与门脉压力** 外科全分流之所以渐被外科限制性分流和TIPS分流所替代,一个主要原因就是分流口径未能很好控制,导致术后门脉压力过低,引起难治的分流性脑病的发生。限制性分流和TIPS的应用极大地改善了这一点,为探求门脉压力在不引起致命并发症的情况下,能降低得最大限度,Chung *et al*<sup>[3]</sup>研究得出: TIPS后门脉压应 $\geq 5$  mmHg(敏感性100%,特异性72%),否则会引起致命的并发症。关于支架的口径目前较为一致观点认为TIPS支架口径应 $\leq 10$  mm,最大应不超过12 mm,分流口径过大并引起门脉压力过度降低而造成难治性分流性脑病,主要根据门脉压力情况做调整。Maleux *et al*<sup>[9]</sup>通过观察介入前后门脉压力变化来观察TIPS术后肝性脑病的发生情况,并对术后发生肝性脑病的患者重新测压发现其分流后平均门脉压为6.8 mmHg(范围为2-16 mmHg),进一步对患者进一步平行支架植入后患者PSE明显改善,说明在某种特定的因素下PSE的发生与支架口径决定的门脉压力的降低密切相关。Lyon *et al*<sup>[6]</sup>报道,在PSE后,进一步平行支架的原TIPS支架拐角处的植入明显的纠正PSE I发生,进一步证实,支架口径以及由此决定的术后门脉压力的变化某种程度上决定了PSE的发生,因此术中需根据情况,严格控制支架的口径。

**3.2 术前肝功能** 大量的研究证实<sup>[1-2,36,74]</sup>, Child-Push分级中Child-Push C级患者较Child-Push A、B级患者分流后PSE的发生率更高,Child-Push分级中, A、B、C级组,肝性脑病的发生情况分别为32%、51%、100%,术前的肝功能某种程度上决定了分流的口径。其中Jacquier *et al*<sup>[22]</sup>在术前评价肝功能,对Child-push分级3级中根据以往的经验术后倾向于发生PSE的Child-push B、C级患者进行分步分流的方法,首先给予口径为6 mm分流,2-6 mo后继续将口径扩大到10 mm,取得满意的效果,术后PSE发生明显减少,术后2 mo未发生死亡病例。进一步说明术前肝功能对术后PSE的影响,并给

出了针对术前倾向发生PSE的患者合理的分流方法: 口径由小到大的分步分流的方法,渐进性影响肝功能,从而达到预防分流性脑病发生的目的。

**3.3 术前后肝脏血流的变化** 我国Deng *et al*<sup>[26,72]</sup>超声下观察到在肝血流动力学改变对TIPS术后肝性脑病发生的影响,相同分流口径下向肝血流术后PSE的发生明显多于离肝血流,二者术后PSE的发生率分别为32.1%, 15.3%, 分析原因,进一步观察到,肝脏靠门脉系统和肝动脉共同供血,门脉血流的减少一定程度上靠肝动脉代偿,而离肝血流的患者较向肝血流的患者更能适应TIPS术后肝血流改变的影响。张家宝 *et al*<sup>[70]</sup>研究进一步根据TIPS术前、后血流的变化,将TIPS术后血流改变分为三级: 将TIPS术后门静脉主干及分支血流均呈向肝型者定为 I 型(未改变),将TIPS术后仅支架所伸入的门静脉支血流呈离肝型者,其他分支仍为向肝血流者定为 II 型(部分变化)。将门静脉血流均呈离肝型,血流方向为门静脉左右支 $\rightarrow$ 肝内分流道 $\rightarrow$ 肝静脉定为 III 型(完全改变),其研究证实肝性脑病的发生 III 型 $>$  II 型 $>$  I 型,分别为60%, 14%, 3%, 说明术后肝血流动力学的改变严重影响到PSE的发生。二者均可说明术前术后肝脏血流的变化影响了术后PSE的发生。目前研究更倾向保护向肝血流,因其直接与肝功能相关,而肝功能又影响术后PSE的发生。目前术中向肝血流的保护仍是需要进一步研究的问题。

**3.4 左右支的选择** 由于右支解剖关系的优越性,大多TIPS治疗倾向于肝右静脉与门脉右支之间建立分流通道。Chu *et al*<sup>[52,73]</sup>研究进一步提示采用10 mm分流口径,门脉左支分流后肝性脑病发生率较右支低,术后观察1年,发生率分别为1.47%和6.1%。其分流道再狭窄率亦明显降低,其可能存在的原因是门静脉左支主要供应占肝脏体积20%-25%的左叶的血流,即便是将左支血液完全性分流,也只有约1/4的肝功损害,与门静脉右支分流后造成75%-80%的肝功能损害相比,优势是显而易见。所以行门静脉左支门腔分流患者的肝功能可以受到极大地保护,自然具有较好的远期疗效。另外其进一步的动物实验中证实: 血氨浓度肠系膜上静脉 $>$ 门静脉 $>$ 脾静脉 $>$ 外周静脉,左支分流,主要分流脾静脉学院,进一步减少血氨的向体循环的分流,从而减少PSE的发生; 以上情况说明分流时左右支的选择也对PSE的发生有一定的影响,术中合理的

选择左、右支也能起到一定的预防肝性脑病的作用。

3.5 其他 近期亦对其他因素进行了大量研究,倾向于年龄大者较年龄小者易发;女性较男性易发(国外);非酒精性肝病者较酒精性肝病者易发;既往有肝性脑病史较既往没有肝性脑病患者发生率高,具体机制不详,尚需进一步理论研究证实<sup>[1,37,43,65]</sup>。

#### 4 治疗

目前尚没有对PSE发生根治性方法,主要以预防为主。术后1 mo内发生PSE I 首先给以保守的药物治疗,如无效多采用平行支架植入或支架栓塞的方法解决<sup>[12,17,18,20,22,24,30,38]</sup>,均可对PSE治疗起到满意的效果,但支架栓塞后对术前原发病的治疗起不到治疗,而对术后分流性脑病的控制效果较迅速;相对的平行支架的植入,虽兼顾原发病的治疗,但延长术后分流性脑病的治疗时间;而对倾向于术后发生PSE的患者进行的分步的渐进性的小口径的分流有效的降低了该组患者的PSE的发生,PSE II 的发生主要是在TIPS门体分流的基础上,高蛋白进食、感染、电解质紊乱、消化系出血、大量放腹水、利尿等诱因的情况下,不同程度增加体内血氨的浓度,从而引发PSE。其以分流为基础,在一个或几个不恰当的因素下诱发PSE。在术后限制蛋白,乳果糖、谷氨酰胺、间断抗生素应用后,可以得到较好的预防。治疗主要同非TIPS术HE相同,主要以支链氨基酸、鸟氨酸、谷氨酸钾/钠为主,其中鸟氨酸通过增加肝内氨的转化起作用,降低血氨。支链氨基酸增加肝内蛋白质的合成,减少蛋白质的分解,来降低血氨。谷氨酸钾/钠通过抑制脑内 $\gamma$ -GABA而起作用<sup>[31-32,35,53,68]</sup>。

#### 5 结论

从目前来看,覆膜支架应用后,相同分流口径下确实使PSE发生较前增多,PSE的具体机制仍不十分清楚。倾向于基于分流引起或分流加重的代谢紊乱,与肝性脑病相同主要是含氮物质的增多有关,与分流后引起门脉-肝静脉的短路,引起肝脏血流动力学的变化,以及由此产生的肝功能和脑血流动力学的变化相关;主要和术前肝功能和分流支架的口径及由其决定的术后门脉压力的降低程度密切相关,也与术后向肝血流的保护和左右支的选择相关,以上因素相互关联,都与TIPS术前、后肝脏的血流动力学相

关,对TIPS后肝性脑病的发生起着一定的作用。其他相关因素尚需进一步证实;在治疗方面主要以小口径分步分流方式和术后限制蛋白,乳果糖、间断抗生素应用等预防性治疗措施为主。术后发生PSE I 内科治疗无效后多采用平行支架植入或支架栓塞的方法解决。以上预防措施以及对患者一般状况的对症及时的处理,加上覆膜支架应用后对同一患者实际分流口径减小,我们对TIPS后肝性脑病控制必将得到极大的提高,患者的生活质量将明显改善,必定会是目前带膜支架应用后对TIPS治疗的极大支持。然而,目前亦对TIPS后无明显临床肝性脑病的症状的患者进行研究。证实49%患者中存在轻微肝性脑病或亚临床肝性脑病的情况,其虽不影响患者一般生活,但对患者进行如开车、书写、画画等精细操作受到一定的限制。总体上,覆膜支架应用后确实使TIPS的治疗作用进一步的得到体现,而术后PSE的发生始终没能得到根本解决,仍是TIPS治疗的真正春天来临的又一难题。

#### 6 参考文献

- 1 Masson S, Mardini HA, Rose JD, Record CO. Hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt insertion: a decade of experience. *QJM* 2008; 101: 493-501
- 2 Haskal ZJ, Radhakrishnan J. Transjugular intrahepatic portosystemic shunts in hemodialysis-dependent patients and patients with advanced renal insufficiency: safety, caution, and encephalopathy. *J Vasc Interv Radiol* 2008; 19: 516-520
- 3 Chung HH, Razavi MK, Sze DY, Frisoli JK, Kee ST, Dake MD, Hellinger JC, Kang BC. Portosystemic pressure gradient during transjugular intrahepatic portosystemic shunt with Viatorr stent graft: what is the critical low threshold to avoid medically uncontrolled low pressure gradient related complications? *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 95-101
- 4 Munoz SJ. Hepatic encephalopathy. *Med Clin North Am* 2008; 92: 795-812, viii
- 5 Colombato L. The role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) in the management of portal hypertension. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41 Suppl 3: S344-S351
- 6 Lyon S. How I do it: flow-limiting stent for intractable encephalopathy following transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Australas Radiol* 2007; 51: 564-566
- 7 Grønbaek H, Thomsen KL, Ott P, Vilstrup H. [Portosystemic shunts versus endoscopic therapy for esophageal varices after the first bleeding: does the Cochrane analysis give a complete answer?] *Ugeskr Laeger* 2007; 169: 2761-2763
- 8 Salerno F, Cammà C, Enea M, Rössle M, Wong F. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for refractory ascites: a meta-analysis of individual

#### ■创新盘点

本文系统、全面、多角度阐述TIPS后肝性脑病的发生、治疗和预防。

## ■应用要点

本文为TIPS治疗后更好控制肝性脑病提供进一步的理论支持。

- 9 Maleux G, Heye S, Verslype C, Nevens F. Management of transjugular intrahepatic portosystemic shunt induced refractory hepatic encephalopathy with the parallel technique: results of a clinical follow-up study. *J Vasc Interv Radiol* 2007; 18: 986-992; quiz 993
- 10 Weitzman G, Schamberg NJ, Lake-Bakaar G. Synergism between hepatocellular injury and shunting in portosystemic encephalopathy (PSE): case report of acute brittle TIPS-induced PSE. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 3270-3274
- 11 Bureau C, Pagan JC, Layrargues GP, Metivier S, Bellot P, Perreault P, Ota P, Abraldes JG, Peron JM, Rousseau H, Bosch J, Vinel JP. Patency of stents covered with polytetrafluoroethylene in patients treated by transjugular intrahepatic portosystemic shunts: long-term results of a randomized multicentre study. *Liver Int* 2007; 27: 742-747
- 12 Pattynama PM, Wils A, van der Linden E, van Dijk LC. Embolization with the Amplatzer Vascular Plug in TIPS patients. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2007; 30: 1218-1221
- 13 Stefánková J, Hůleki P, Babu A, Cermáková E, Safka V, Stefanek J, Fejfar T, Krajina A. Hepatic encephalopathy due to TIPS--retrospective study. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 480-484
- 14 Weintraub JL, Mobley DG, Weiss ME, Swanson E, Kothary N. A novel endovascular adjustable polytetrafluoroethylene-covered stent for the management of hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *J Vasc Interv Radiol* 2007; 18: 563-566
- 15 Semiz-Oysu A, Moustafa T, Cho KJ. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt prior to cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Heart Lung Circ* 2007; 16: 465-468
- 16 Maleux G, Verslype C, Heye S, Wilms G, Marchal G, Nevens F. Endovascular shunt reduction in the management of transjugular portosystemic shunt-induced hepatic encephalopathy: preliminary experience with reduction stents and stent-grafts. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188: 659-664
- 17 Holden A, Ng R, Gane E, Hill A, McCall J. A technique for controlled partial closure of a transjugular intrahepatic portosystemic shunt tract in a patient with hepatic encephalopathy. *J Vasc Interv Radiol* 2006; 17: 1957-1961
- 18 Stadlbauer V, Tauss J, Portugaller HR, Stiegler P, Iberer F, Stauber RE. Hepatic encephalopathy following transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS): management with L-ornithine-L-aspartate and stent reduction. *Metab Brain Dis* 2007; 22: 45-50
- 19 Khan S, Tudur Smith C, Williamson P, Sutton R. Portosystemic shunts versus endoscopic therapy for variceal rebleeding in patients with cirrhosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; CD000553
- 20 Tripathi D, Redhead D. Transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt: technical factors and new developments. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 1127-1133
- 21 Firriolo FJ. Dental management of patients with end-stage liver disease. *Dent Clin North Am* 2006; 50: 563-590, vii
- 22 Jacquier A, Vidal V, Monnet O, Varoquaux A, Gaubert JY, Champsaur P, Gerolami R, Bartoli JM, Moulin G. A modified procedure for transjugular intrahepatic portosystemic shunt flow reduction. *J Vasc Interv Radiol* 2006; 17: 1359-1363
- 23 Garcia-Tsao G. The transjugular intrahepatic portosystemic shunt for the management of cirrhotic refractory ascites. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 380-389
- 24 Fanelli F, Salvatori FM, Corona M, Bruni A, Pucci A, Boatta E, Dominelli V, Conchiglia A, Passariello R. Stent graft in TIPS: technical and procedural aspects. *Radiol Med* 2006; 111: 709-723
- 25 Bureau C. Covered stents for TIPS: are all problems solved? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2006; 18: 581-583
- 26 Deng D, Liao MS, Qin JP, Li XA. Relationship between pre-TIPS hepatic hemodynamics and postoperative incidence of hepatic encephalopathy. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2006; 5: 232-236
- 27 Henderson JM, Boyer TD, Kutner MH, Galloway JR, Rikkers LF, Jeffers LJ, Abu-Elmagd K, Connor J. Distal splenorenal shunt versus transjugular intrahepatic portal systematic shunt for variceal bleeding: a randomized trial. *Gastroenterology* 2006; 130: 1643-1651
- 28 Mullen KD, Ghanta RK, Putka BS. Prevention of first overt episode of hepatic encephalopathy after TIPS: no easy task. *Hepatology* 2006; 43: 1155-1156
- 29 Kochar N, Tripathi D, Ireland H, Redhead DN, Hayes PC. Transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt (TIPSS) modification in the management of post-TIPSS refractory hepatic encephalopathy. *Gut* 2006; 55: 1617-1623
- 30 Wróblewski T, Rowiński O, Ziarkiewicz-Wróblewska B, Górnicka B, Albrecht J, Jones EA, Krawczyk M. Two-stage transjugular intrahepatic porta-systemic shunt for patients with cirrhosis and a high risk of portal-systemic encephalopathy patients as a bridge to orthotopic liver transplantation: a preliminary report. *Transplant Proc* 2006; 38: 204-208
- 31 Sanyal AJ. Pros and cons of TIPS for refractory ascites. *J Hepatol* 2005; 43: 924-925
- 32 Bahn E, Wiltfang J, Nolte W, Ramadori G, Steinhoff B, Rütger E, Kurth C. Quantification of changes in electroencephalographic power spectra in a patient with Budd-Chiari-syndrome after implantation of a transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt (TIPSS). *Metab Brain Dis* 2005; 20: 1-6
- 33 Albillos A, Bañares R, González M, Catalina MV, Molinero LM. A meta-analysis of transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus paracentesis for refractory ascites. *J Hepatol* 2005; 43: 990-996
- 34 Riggio O, Masini A, Efrati C, Nicolao F, Angeloni S, Salvatori FM, Bezzi M, Attili AF, Merli M. Pharmacological prophylaxis of hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunt: a randomized controlled study. *J Hepatol* 2005; 42: 674-679
- 35 Morgan MY, Amodio P. Treatment for hepatic encephalopathy: tips from TIPS? *J Hepatol* 2005; 42: 626-628
- 36 Deltenre P, Mathurin P, Dharancy S, Moreau R, Bulois P, Henrion J, Pruvot FR, Ernst O, Paris JC, Lebre D. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt in refractory ascites: a meta-analysis. *Liver Int* 2005; 25: 349-356
- 37 Macedo TA, Andrews JC, Kamath PS. Ectopic varices in the gastrointestinal tract: short- and long-

- term outcomes of percutaneous therapy. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2005; 28: 178-184
- 38 Clarke G, Patel R, Tsao S, Blanshard K. Treatment of refractory post-transjugular portosystemic shunt encephalopathy: a novel case of stent luminal reduction. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1387-1390
  - 39 Charon JP, Alaeddin FH, Pimpalwar SA, Fay DM, Olliff SP, Jackson RW, Edwards RD, Robertson IR, Rose JD, Moss JG. Results of a retrospective multicenter trial of the Viatorr expanded polytetrafluoroethylene-covered stent-graft for transjugular intrahepatic portosystemic shunt creation. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 1219-1230
  - 40 Salerno F, Merli M, Riggio O, Cazzaniga M, Valeriano V, Pozzi M, Nicolini A, Salvatori F. Randomized controlled study of TIPS versus paracentesis plus albumin in cirrhosis with severe ascites. *Hepatology* 2004; 40: 629-635
  - 41 Wallace MJ, Madoff DC, Ahrar K, Warneke CL. Transjugular intrahepatic portosystemic shunts: experience in the oncology setting. *Cancer* 2004; 101: 337-345
  - 42 Maleux G, Nevens F, Wilmer A, Heye S, Verslype C, Thijs M, Wilms G. Early and long-term clinical and radiological follow-up results of expanded-polytetrafluoroethylene-covered stent-grafts for transjugular intrahepatic portosystemic shunt procedures. *Eur Radiol* 2004; 14: 1842-1850
  - 43 Cox MW, Lin PH, Bush RL, Lumsden AB. Reversal of transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS)-induced hepatic encephalopathy using a strictured self-expanding covered stent. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2003; 26: 539-542
  - 44 ter Borg PC, Hollemans M, Van Buuren HR, Vleggaar FP, Groeneweg M, Hop WC, Laméris JS. Transjugular intrahepatic portosystemic shunts: long-term patency and clinical results in a patient cohort observed for 3-9 years. *Radiology* 2004; 231: 537-45
  - 45 Mullen KD. Interplay of portal pressure, portal perfusion and hepatic arterial inflow in modulating expression of hepatic encephalopathy in patients with spontaneous or artificially created portosystemic shunts. *Indian J Gastroenterol* 2003; 22 Suppl 2: S25-S27
  - 46 Sachdev A, Duseja A. Decompressive shunts and hepatic encephalopathy. *Indian J Gastroenterol* 2003; 22 Suppl 2: S21-S24
  - 47 Testino G, Ferro C, Sumberaz A, Messa P, Morelli N, Guadagni B, Ardizzone G, Valente U. Type-2 hepatorenal syndrome and refractory ascites: role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt-shunt in eighteen patients with advanced cirrhosis awaiting orthotopic liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1753-1755
  - 48 Mendez C, Marsano L, Wright R. Complications of cirrhosis. *J Ky Med Assoc* 2003; 101: 403-414
  - 49 Thuluvath PJ, Bal JS, Mitchell S, Lund G, Venbrux A. TIPS for management of refractory ascites: response and survival are both unpredictable. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 542-550
  - 50 Astrup LB, Grønbaek H, Redsted S, Nielsen DT, Vilstrup H. [TIPS--transjugular intrahepatic portosystemic shunt. Experiences from a recently started center] *Ugeskr Laeger* 2003; 165: 443-446
  - 51 Grønbaek H, Astrup LB, Nielsen DT, Vilstrup H. [Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) for the treatment of complications of portal hypertension in patients with liver cirrhosis] *Ugeskr Laeger* 2003; 165: 439-442
  - 52 Chu J, Sun X, Piao L, Chen Z, Huang H, Lu C, Xu J. [Portosystemic shunt via the left branch of portal vein for the prevention of encephalopathy following transjugular intrahepatic portosystemic shunt] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002; 10: 437-440
  - 53 Sauer P, Hansmann J, Richter GM, Stremmel W, Stiehl A. Endoscopic variceal ligation plus propranolol vs. transjugular intrahepatic portosystemic shunt: a long-term randomized trial. *Endoscopy* 2002; 34: 690-697
  - 54 Stefánková J, Fejfar T, Safka V, Hůlek P, Krajina A, Fendrichová M. [Hepatic encephalopathy after TIPS--retrospective study] *Vnitř Lek* 2002; 48: 390-395
  - 55 Domagk D, Patch D, Dick R, Grosso M, Rousseau H, Otal P, Goffette P, Heinecke A, Drees M, Domschke W, Menzel J. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt in the treatment of portal hypertension using memotherm stents: a prospective multicenter study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2002; 25: 506-512
  - 56 Mullen KD. Newer aspects of hepatic encephalopathy. *Indian J Gastroenterol* 2003; 22 Suppl 2: S17-S20
  - 57 Escorsell A, Bañares R, García-Pagán JC, Gilibert R, Moitinho E, Piqueras B, Bru C, Echenagusia A, Granados A, Bosch J. TIPS versus drug therapy in preventing variceal rebleeding in advanced cirrhosis: a randomized controlled trial. *Hepatology* 2002; 35: 385-392
  - 58 Kramer L, Bauer E, Gendo A, Funk G, Madl C, Pidlich J, Gangl A. Neurophysiological evidence of cognitive impairment in patients without hepatic encephalopathy after transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 162-166
  - 59 Klemptnaue J, Schrem H. Review: surgical shunts and encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2001; 16: 21-25
  - 60 Patel NH, Sasadeusz KJ, Seshadri R, Chalasani N, Shah H, Johnson MS, Namyslowski J, Moresco KP, Trerotola SO. Increase in hepatic arterial blood flow after transjugular intrahepatic portosystemic shunt creation and its potential predictive value of postprocedural encephalopathy and mortality. *J Vasc Interv Radiol* 2001; 12: 1279-1284
  - 61 Douglass A, Al Mardini H, Record C. Amino acid challenge in patients with cirrhosis: a model for the assessment of treatments for hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2001; 34: 658-664
  - 62 Huber M, Rössle M, Siegerstetter V, Ochs A, Haag K, Kist M, Blum HE. Helicobacter pylori infection does not correlate with plasma ammonia concentration and hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 541-544
  - 63 Ong JP, Mullen KD. Hepatic encephalopathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 325-334
  - 64 Hassoun Z, Deschênes M, Lafortune M, Dufresne MP, Perreault P, Lepanto L, Gianfelice D, Bui B, Pomier-Layrargues G. Relationship between pre-TIPS liver perfusion by the portal vein and the incidence of post-TIPS chronic hepatic encephalopathy. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1205-1209
  - 65 Jalan R, Newby DE, Olde Damink SW, Redhead

## 同行评价

本文作者重点综述了近年来有关TIPS后肝性脑病的发生机制、影响因素、预防及治疗方面的进展, 比较全面, 所引用的文献均比较新, 对读者进一步认识TIPS后肝性脑病的发生及其治疗有一定指导作用。



- DN, Hayes PC, Lee A. Acute changes in cerebral blood flow and metabolism during portosystemic shunting. *Liver Transpl* 2001; 7: 274-278
- 66 Pomier-Layrargues G, Villeneuve JP, Deschênes M, Bui B, Perreault P, Fenyses D, Willems B, Marleau D, Bilodeau M, Lafortune M, Dufresne MP. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) versus endoscopic variceal ligation in the prevention of variceal rebleeding in patients with cirrhosis: a randomised trial. *Gut* 2001; 48: 390-396
- 67 Hamuro M, Nakamura K, Matsuoka T, Kaminou T, Higashida M, Yamada R. Proton MR spectroscopy of the brain in patients treated with TIPS. *Acta Radiol* 2000; 41: 567-571
- 68 Kamath PS, Lacerda M, Ahlquist DA, McKusick MA, Andrews JC, Nagorney DA. Gastric mucosal responses to intrahepatic portosystemic shunting in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 2000; 118: 905-911
- 69 Wiltfang J, Nolte W, von Heppe J, Bahn E, Pilz J, Hajak G, Rütther E, Ramadori G. Sleep disorders and portal-systemic encephalopathy following transjugular intrahepatic portosystemic shunt in patients with liver cirrhosis. Relation to plasma tryptophan. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 169-176
- 70 张家宝, 王茂强. TIPSS术后肝性脑病的发生与门静脉血流方向的关系—附212例分析. *新医学* 2007; 32: 330-331
- 71 徐克, 钟红珊. 迎接TIPS发展的第二个春天. *放射学实践* 2006; 21: 449-450
- 72 邓旦, 秦建平, 廖明松, 李树森, 马琳英, 黄静, 唐文. 经颈静脉肝内门体分流术前肝血流动力学状态与术后肝性脑病发生的相关性研究. *中华超声影像学杂志* 2004; 13: 670-673
- 73 诸建国, 朴龙松, 陈肇一, 黄鹤, 吕春燕, 徐家兴, 孙晓丽. 门静脉左支分流降低术后肝性脑病的临床研究. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 437-440
- 74 陈文红, 农玉新, 刘阳生. 经颈静脉肝内门腔静脉内支架分层术后并发肝性脑病的分析. *中国医师杂志* 2003; 5: 42-43
- 75 左国杰, 杨立群, 马光, 张福君. 肝性脑病与TIPSS过程中氧自由基变化关系的实验研究. *中华临床医药杂志* 2003; 4: 30-31

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

# 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨 国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知

本刊讯 由广东省中西医结合学会脾胃消化病专业委员会, 广东省中医药学会消化病专业委员会主办的2009年脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班将于2009-09-25/27在广东省广州市召开, 现将会议征文有关事项通知如下:

### 1 征稿内容

中西医结合、中医治疗消化系统疾病的基础理论研究、临床经验总结、诊治的新进展, 名老中医、西医和中西医结合专家个人诊治特色总结.

### 2 征稿要求

论文资料务必真实可靠, 书写规范, 简明扼要, 每篇以3000字以内为宜, 并附800字左右的摘要1份; 来稿请用电脑打印, 用word软件编入, 并附软盘, 或发送电子邮件, 文稿中请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码及联系电话. 截稿日期: 2009-07-30

### 3 交流方式

专题报告、论文宣读与讨论答疑相结合. 入选论文并参会者给予记I类学分6分, 另外将择优编入《现代消化及介入诊疗》杂志. 参加继续教育研讨班者另给予国家级一类学分12分.

### 4 投稿地址

(1)E-mail: zhangwdcn@163.com; (2)全文、摘要并附软盘寄至广东省广州市广州大道北1838号南方医院消化编辑部罗永华同志(邮编: 510105); 并注明脾胃消化病学术会议投稿. 无论文者也欢迎参会或报名参加研讨班.

### 5 联系方式

姚永莉, 510105, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医院消化内科, 电话: 13189096556

## 川芎嗪对HSC-T6增殖的影响

汪晓军, 马 赟, 李秀惠, 张奉学, 刘 妮

汪晓军, 李秀惠, 首都医科大学附属北京佑安医院中西医结合科 北京市 100069

马赟, 首都医科大学中医药学院中医基础教研室 北京市 100069

张奉学, 刘妮, 广州中医药大学热带医学研究所 广东省广州市 510405

北京市中医药科技基金资助项目, No. JJ2003-06

作者贡献分布: 此课题由汪晓军设计; 研究过程由汪晓军、刘妮、张奉学及马赟操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张奉学提供; 数据分析由汪晓军、马赟及刘妮完成; 本论文写作由汪晓军与马赟完成, 李秀惠指导。

通讯作者: 汪晓军, 100069, 北京市丰台区右安门外西头条8号, 首都医科大学附属北京佑安医院中西医结合科。

w\_xiaojun@126.com

电话: 010-83997027 传真: 010-63296491

收稿日期: 2008-12-26 修回日期: 2009-02-14

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-18

### Influence of *ligustrazine* on the proliferation of hepatic stellate cell line T6

Xiao-Jun Wang, Yun Ma, Xiu-Hui Li, Feng-Xue Zhang, Ni Liu

Xiao-Jun Wang, Xiu-Hui Li, Department of Integrated with Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Yun Ma, School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Feng-Xue Zhang, Ni Liu, Institute of Tropical Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Supported by: the Science and Technology Project of Beijing Traditional Chinese Medicine, No. JJ2003-06

Correspondence to: Dr. Xiao-Jun Wang, Department of Integrated with Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, 8 Xitoutiao, Youanmenwai Street, Fengtai District, Beijing 100069, China. w\_xiaojun@126.com

Received: 2008-12-26 Revised: 2009-02-14

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-18

### Abstract

**AIM:** To study influence of *ligustrazine*, the main ingredients of Chinese herbal medicine named Chuanxiong, on cell proliferation of hepatic-stellate-cell-T6 cell line.

**METHODS:** HSC-T6 was incubated into 96-well plate at a concentration of  $2.0 \times 10^5/L$ , 24 h later, *ligustrazine* at different concentrations were added 0.1 mL/well. At the forth day, value of cell

was measured using MTT. The inhibition ratio of proliferation was measured.

**RESULTS:** Proliferation of HSC-T6 was inhibited by *ligustrazine*. The higher the concentration was, the stronger the inhibitory effects were. It had a dose-dependent relationship. Inhibition ratios of proliferation at different concentrations were 42.5%, 28.8%, and 26%, respectively.

**CONCLUSION:** *Ligustrazine* has obvious inhibitory effect on proliferation of HSC-T6 in a dosage-dependent manner.

**Key Words:** *Ligustrazine*; Hepatic-stellate-cell; Cell proliferation

Wang XJ, Ma Y, Li XH, Zhang FX, Liu N. Influence of *ligustrazine* on the proliferation of hepatic stellate cell line T6. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 809-812

### 摘要

**目的:** 研究川芎有效成分川芎嗪对HSC-T6细胞增殖的影响。

**方法:** 以HSC-T6浓度 $2.0 \times 10^5/L$ 、每孔0.1 mL接种96孔板, 培养24 h后将不同稀释度的川芎嗪按0.1 mL/孔加入培养孔。实验第4天以MTT法测定细胞A值, 计算增殖抑制率。实验另设培养液空白对照组和细胞对照组。

**结果:** 川芎嗪具有较明显的抑制HSC-T6增殖的作用, 随着药物浓度的增大, 其对HSC-T6增殖的抑制作用逐渐增强, 有一定的量效关系。川芎嗪原液和1/2、1/4倍稀释浓度时的抑制率分别为42.5%、28.8%和26%, 1/8以下浓度则抑制率虽然有所降低但下降趋势较缓。

**结论:** 川芎嗪有抑制HSC-T6细胞增殖的作用并有明显的浓度依赖。

**关键词:** 川芎嗪; 肝星状细胞; 细胞增殖

汪晓军, 马赟, 李秀惠, 张奉学, 刘妮. 川芎嗪对HSC-T6增殖的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 809-812

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/809.asp>

### ■背景资料

肝星状细胞(HSC)活化并合成大量的细胞外基质(ECM)在肝内沉积是肝纤维化形成、发展的核心环节。目前抗纤维化治疗的主要靶点集中在活化的HSC及其相关细胞因子方面, 抑制HSC增殖对于控制肝纤维化有重要意义。川芎是肝纤维化治疗的常用药, 川芎嗪则可能是其发挥作用的主要药物成分。

### ■同行评议者

石统东, 副教授, 重庆医科大学附属第二医院感染病科

## ■研发前沿

在抗纤维化的实验研究中如何控制中心细胞环节、减少细胞外基质的沉积及相关机制仍是学者们探讨和研究的重点。

## 0 引言

肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)位于Disse间隙,紧贴肝窦内皮细胞和肝细胞,正常肝脏中HSC的数目很少,约占肝细胞总数的5%-8%,富含VitA脂滴,参与VitA代谢和合成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)<sup>[1-2]</sup>。肝星状细胞是肝脏病理情况下ECM沉积的主要细胞来源, HSC在纤维化发生发展以及转变中处于中心细胞环节的地位。川芎是活血化瘀中药的常用药,川芎嗪是川芎的主要成分,本研究旨在观察川芎嗪对HSC增殖的影响,探讨其减少胶原分泌、阻止肝纤维化的作用方式。

## 1 材料和方法

1.1 材料 HSC-T6细胞系,上海中医药大学肝病研究所所长徐列明教授惠赠。川芎嗪( $C_8H_{12}N_2$ : 136.2)由中药川芎经加工提取而成,本实验所用的标准品川芎嗪购自广州市药物研究中心。高糖DMEM培养液、HEPEPS购自美国Gibco公司;胎牛血清购自中国医学科学院血液学研究所;L-谷氨酰胺、二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)和胰蛋白酶均购自Sigma公司;EDTA自上海生工生物工程公司Amresco进口分装;青霉素、链霉素购自华北制药有限公司。YJ-875型医用净化工作台,苏州净化设备公司;细胞培养瓶(Corning公司);细胞培养板(Braun公司);细胞计数板;微孔滤膜( $0.45\ \mu\text{m}$ 、 $0.2\ \mu\text{m}$ ),上海半岛实业有限公司;Leica荧光生物显微镜;倒置显微镜(Olympus, BX60); $-86^\circ\text{C}$ 超低温冰箱(美国Revco);美国SHELDON2300-2E型电热恒温二氧化碳培养箱;美国宝特ELX800型全自动酶标仪。

### 1.2 方法

1.2.1 药物处理:实验前配制备用原液:川芎嗪 $20\ \text{mmol/L}$ ( $2.724\ \text{g/L}$ )。将药液先 $60^\circ\text{C}$ 水浴2 h以增加药效,然后置 $80^\circ\text{C}$ 水浴30 min,连续3 d以间歇灭菌处理,继用离心机以 $1000\ \text{r/min}$ 速度离心10 min,并用 $0.45$ 和 $0.22\ \mu\text{m}$ 双层微孔滤膜过滤除菌处理, $-20^\circ\text{C}$ 保存备用。临用时配成能维持细胞基本生活需要的含 $20\ \text{g/L}$ 胎牛血清的高糖DMEM培养液并倍比稀释为十种所需浓度。

1.2.2 细胞生长动态观察:取第3代单细胞悬液,常规细胞计数,以保持细胞良好生长状态的含 $50\ \text{g/L}$ 胎牛血清的高糖DMEM培养液稀释成所需浓度。按细胞浓度 $0.5$ 、 $1.0$ 、 $1.5$ 、 $2.0$ 、 $2.5$ 、 $3.0$ 、 $3.5$ 、 $4.0\times 10^8$ (个/L)、 $0.1\ \text{mL/孔}$ 分别接种于96孔板。

置培养箱培养,每24 h观察细胞形态及其生长状况,以MTT法用酶标仪测定 $490\ \text{nm}$ 波长处细胞吸光度值(A值)并取均数,实验另设培养液空白对照组和细胞对照组各四孔。根据每天所测A值均数与对照组A值的比值,绘制细胞生长曲线。

1.2.3 细胞增殖活性的检测:不同浓度及生长时间细胞A值的测定按噻唑蓝比色法(MTT法)检测<sup>[3]</sup>。轻轻吸取培养孔中的培养液并弃去,向培养孔中加入 $400\ \text{mg/L}$ 的MTT液 $0.1\ \text{mL/孔}$ ,置于 $37^\circ\text{C}$ 、 $50\ \text{mL/L}$   $\text{CO}_2$ 培养箱内孵育,4 h后即可见有黄黑色甲瓚(Formazan)颗粒,轻轻吸去MTT液但不接触细胞层,继则加入100% DMSO  $0.1\ \text{mL/孔}$ , $37^\circ\text{C}$ 、 $50\ \text{mL/L}$   $\text{CO}_2$ 培养箱内密闭孵育待甲瓚颗粒完全溶解(约10 min)呈蓝紫色,轻轻摇匀或在微型振荡器震荡5 min后,用全自动酶标仪在 $490\ \text{nm}$ 波长处作比色法测定各孔A值,空白对照孔中加入100% DMSO  $0.1\ \text{mL/孔}$ ,测得的各复孔A值取平均数。

1.2.4 细胞复苏与冻存:采用常规方法操作。

1.2.5 细胞培养与传代:参考文献方法[4-5]和本实验室经验,高糖DMEM培养液培养,临用时添加胎牛血清至终浓度为 $100\ \text{mL/L}$ ,谷氨酰胺终浓度为 $0.03\%$ ,青霉素、链霉素为各 $100\ \text{IU/mL}$ ,用 $0.238\%$  Hepes调pH值至6.8。常规细胞复苏后接种于培养瓶,待细胞生长至铺满瓶底60%面积时,用 $2.5\ \text{g/L}$ 胰蛋白酶和 $0.02\%$  EDTA消化30 s-1 min左右,静置约30 s-1 min左右,加入培养液 $16\ \text{mL}$ ,轻轻吹打贴壁细胞,将制成的单个细胞悬液按每瓶 $8\ \text{mL}$ 分别接种于两个培养瓶,置 $37^\circ\text{C}$ 、饱和湿度、 $50\ \text{mL/L}$   $\text{CO}_2$ 培养箱内培养,传代后的细胞在6-8 h便可贴壁生长,24 h后更换1次培养液。

1.2.6 实验方案和技术路线:根据实验的基本要求,设立实验及对照组。具体可将培养的HSC-T6分为三组,每组可分为若干药物浓度小组,各小组按需由多个复孔组成。正常细胞组:实验前后和检测指标时没有施加因素。对照细胞组:培养基中加正常含血清培养液,检测指标时作阳性对照组。药物作用组:培养基中加含药物培养液。

1.2.7 药物对HSC-T6细胞增殖的影响:将复苏后处于对数生长期的HSC-T6细胞,用 $2.5\ \text{g/L}$ 胰蛋白酶将HSC-T6细胞分散成单个细胞悬液,以含 $50\ \text{g/L}$ 胎牛血清的高糖DMEM培养液混匀稀释成浓度为 $2.0\times 10^8$ 个/L,并以 $0.1\ \text{mL/孔}$ 接种于96孔板中,置于 $37^\circ\text{C}$ 、饱和湿度、 $50\ \text{mL/L}$   $\text{CO}_2$ 培养箱内培养,24 h后将川芎嗪的各种不同稀释浓

## ■相关报道

肝星状细胞的活化是肝纤维化的中心细胞环节,近年研究发现血管紧张素II、过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 等对HSC增殖均有一定抑制,从而对控制纤维化起到重要作用,这为相关中医药的研究开启思路。

表 1 川芎嗪对HSC-T6增殖的抑制率

	川芎嗪稀释度										对照 细胞
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	
A	0.782	0.969	1.006	1.153	1.138	1.194	1.214	1.186	1.280	1.397	1.317
IE(%)	42.5	28.8	26.0	15.2	16.3	12.2	10.7	12.8	5.9	-2.7	-

度的药物按0.1 mL/孔加入培养孔, 各个浓度均设3个复孔。

实验开始后, 每24 h观察细胞形态及其生长状况, 实验第4天轻轻吸去各药物各浓度下3孔培养细胞的上清液, 所余细胞以MTT法用酶标仪测定A值(490 nm)并取均数。实验另设培养液空白对照组和细胞对照组, 分别设4个和2个复孔。按文献方法<sup>[6]</sup>, 根据所测的药物组和对照组细胞的吸光度值的比值计算出药物对细胞增殖的抑制率, 探索药物对细胞生长规律的影响。公式如下:  $IE = 1 - A_i/A_0$ 。IE表示药物对细胞增殖率的抑制率,  $A_i$ 表示某药物浓度下的吸光度值,  $A_0$ 表示对照组细胞的吸光度值。

**统计学处理** 各组数值与对照细胞比较采用单样本 $t$ 检验, SPSS10.0统计学软件处理。

## 2 结果

**2.1 川芎嗪对HSC-T6细胞增殖的作用** 川芎嗪具有较明显的抑制HSC-T6增殖的作用, 与对照组比较差异显著( $P < 0.05$ )。随着药物浓度的增大, 其对HSC-T6增殖的抑制作用逐渐增强, 有一定的量效关系, 药物的高浓度与低浓度对细胞增殖抑制作用有差别。结合显微镜下的观察结果可以看出, 川芎嗪对细胞增殖的抑制作用较为稳定, 且对细胞生长的负面影响或破坏程度较低(表1, 图1)。

**2.2 镜下观察** 1/1-1/2川芎嗪浓度时, 可见轻度细胞破坏。细胞生长缓慢, 有细胞皱缩现象, 胞质可有减少, 胞核、胞质颜色有所加深, 透亮度下降, 可见少量细丝状突起, 细胞形态欠佳, 多数聚集成岛状, 亦有散在细胞贴壁生长。培养液基本清澈, 无脱落细胞和漂浮物。1/4浓度时细胞破坏±, 较上两组细胞损伤较轻, 少部分细胞形态略差, 可见颜色加深、胞质减少和胞核缩小。大多数细胞生长较好, 数量较多, 形态基本正常, 细胞连接成片状, 密度较正常略低, 可见星状突起或丝状突出互相连接。1/8-1/512浓度时无细胞破坏, 细胞生长致密, 形态正常。

## 3 讨论

肝纤维化是肝脏对各种慢性损伤的一种修复

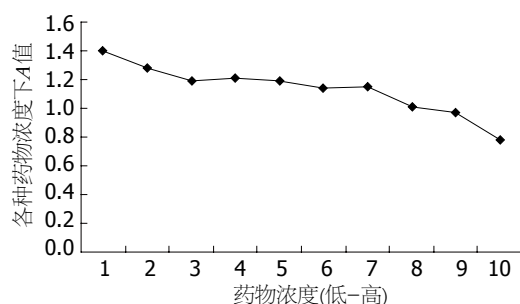


图 1 川芎嗪抑制HSC-T6细胞增殖示意图。

应答反应, 其病理中心环节之一是HSC由静止状态转变为活化状态, 成为肝纤维化形成的主要细胞学基础。HSC又称Ito细胞, 贮脂细胞, 位于Disse间隙, 正常状态下, HSC主要贮存和代谢维生素A脂滴, 肝受损时, HSC在多种因素下被激活, 转化为肌成纤维细胞(myofibroblast, MFB)表达多种细胞因子和受体, 进一步增殖, 合成并分泌大量ECM, 并表达 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA), 具有收缩功能<sup>[7]</sup>。HSC的活化具体表现在: 细胞体积增大, 伸出星状伪足, 含维生素A的脂肪滴明显减少, 细胞表型向成纤维母细胞和肌成纤维样细胞(myofibroblast-like cell)转化; 细胞获得增殖能力; 纤维化能力增强, 能生成大量细胞外基质; 表达平滑肌细胞骨架蛋白等。HSC活化与增殖是密切相关的过程, 活化的HSC不仅具备了活跃的分裂增殖能力, 而且可激活其他静止状态的HSC转变为活化状态的HSC, 最终转化为肌成纤维样细胞。HSC活化是肝纤维化过程中的重要病理过程, 而HSC增殖又是HSC活化的重要特征之一, 抑制HSC增殖即可显著影响HSC的活化过程, 即是其抗肝纤维化的作用机制和作用途径之一。

我们已经证实, 药物的主要有效成分对HSC-T6细胞分泌uPA和PAI-1有明显的影响和调节作用, 由于HSC的活跃增殖能力与肝纤维化的发生、发展密切相关, 同时也与uPA和PAI-1的分泌密切相关。因此, 通过川芎嗪对HSC-T6细胞增殖抑制作用的研究, 有利于揭示川芎影响或调节HSC-T6细胞分泌uPA和PAI-1的机制, 有助

### ■创新盘点

本实验通过川芎嗪作用于体外培养的星状细胞并观察其对细胞增殖的影响, 探讨川芎嗪抗纤维化作用的机制。



### ■同行评价

本研究结果可信,论据充分,讨论科学,具有一定的科学指导意义。

于揭示活血化瘀药对HSC增殖的抑制作用与其抗肝纤维化作用的真正关系。

药物对细胞增殖的抑制理论上就意味着对细胞的损伤,只是程度轻重、可逆与否的问题,与药物浓度呈明显相关并有明显的量效关系,从理论上分析是基本一致并有一定根据的。川芎嗪对HSC-T6细胞也有一定的损伤,并且对HSC-T6细胞增殖的抑制作用与其破坏和损伤作用似乎显示有一定的相关关系。判断药物对细胞增殖的抑制作用的同时,须考虑药物对细胞活性、功能和结构的影响、损伤甚至破坏作用。从实验结果和示图来看,川芎嗪对HSC-T6细胞有明显的抑制作用且抑制作用比较稳定,较高浓度和中低浓度对细胞均无明显的损伤和影响。

川芎的有效成分对HSC-T6细胞增殖有明显的抑制作用,可以促进HSC-T6细胞分泌uPA或(和)抑制PAI-1的分泌继而促进细胞外基质的降解而逆转肝纤维化,因此在一定程度内可以提示,这种药物对HSC-T6细胞增殖的抑制作用与对HSC-T6细胞分泌系统的调节存在可能的相关性。但由于细胞的分泌机制是十分复杂的过程,细胞内环境失衡、外环境改变及多种致变因素都能够改变或影响细胞的分泌过程,而目前还

没有根据证明该药物对HSC-T6细胞增殖的抑制是影响HSC-T6细胞分泌的直接因素,所以有待于进一步的研究中探讨其相关机制。

川芎嗪对HSC-T6细胞均有明显抑制HSC-T6增殖的作用,且有明显的浓度依赖。川芎的抗肝纤维化作用可能与其对HSC细胞增殖的抑制作用有关。

**致谢:** 感谢上海中医药大学肝病研究所徐列明教授对本课题的支持。

### 4 参考文献

- 1 张锦生. 肝星状细胞激活的内在机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 831-834
- 2 饶慧琪, 魏来. 肝星状细胞的生物学特性及活化调控机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 671-674
- 3 Sargent JM, Taylor CG. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 1989; 60: 206-210
- 4 杨玲, 朱清静, 侯晓华, 胡胜军, 徐敏, 朱锐. 血管紧张素 II 对肝星状细胞迁移和增殖的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1004-1007
- 5 陈瑞, 杨胜兰. PPAR $\gamma$ 表达上调体外抑制肝星状细胞的增殖. 世界华人消化杂志 2007; 15: 3527-3530
- 6 程宝鸾. 动物细胞培养技术. 第1版. 广州: 华南理工大学出版社, 2001: 131-132
- 7 Lee KS, Lee SJ, Park HJ, Chung JP, Han KH, Chon CY, Lee SI, Moon YM. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells. *Yonsei Med J* 2001; 42: 1-8

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

### • 消息 •

## 世界华人消化杂志标点符号用法

**本刊讯** 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末。标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体。(常务副总编辑: 张海宁 2009-03-18)

# 选择性iNOS抑制剂对肝硬化大鼠门脉高压性胃黏膜病变的影响

王凝, 展玉涛, 高福生, 刘宾

王凝, 展玉涛, 高福生, 刘宾, 首都医科大学附属北京同仁医院消化内科 北京市 100730

作者贡献分布: 所有作者对此文贡献均等; 此课题由刘宾、展玉涛及王凝设计; 研究过程由王凝、高福生、展玉涛及刘宾操作完成; 数据分析由王凝与刘宾完成; 本论文写作由王凝、展玉涛及刘宾完成。

通讯作者: 刘宾, 100730, 北京市东城区东交民巷1号, 首都医科大学附属北京同仁医院消化内科. l.b.44@medmail.com.cn  
电话: 010-58268473

收稿日期: 2009-01-18 修回日期: 2009-02-16

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-18

## Effect of iNOS inhibitor on portal hypertensive gastropathy in cirrhotic rats

Ning Wang, Yu-Tao Zhan, Fu-Sheng Gao, Bin Liu

Ning Wang, Yu-Tao Zhan, Fu-Sheng Gao, Bin Liu, Department of Gastroenterology, Beijing Tongren Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100730, China

Correspondence to: Bin Liu, Department of Gastroenterology, Beijing Tongren Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100730, China. l.b.44@medmail.com.cn

Received: 2009-01-18 Revised: 2009-02-16

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect and mechanism of aminoguanidine (AG) on the portal hypertensive gastropathy in cirrhotic rats.

**METHODS:** Thirty male SD rats were randomly divided into three groups: control group ( $n = 10$ ), model group ( $n = 10$ ) and AG treatment group ( $n = 10$ ) (AG group). The model group was induced through subcutaneous injection of  $\text{CCl}_4$  for 12 weeks, AG group was given subcutaneous injection of  $\text{CCl}_4$  together with oral administration of AG. The morphological and histological changes in gastric mucosa were evaluated. The expression of iNOS in gastric mucosa was detected by SABC immunohistochemical methods. And the ulcer-index (UI) of gastric mucosa, and portal pressure were measured in each group.

**RESULTS:** Histological changes of gastric mu-

cosa was milder and ulcer index of gastric mucosa was significantly lower in AG group than in model group ( $3.00 \pm 2.31$  vs  $10.60 \pm 3.47$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of iNOS (optical density and area density) in gastric mucosa was significantly higher in model group than in control group ( $0.64 \pm 0.04$  vs  $0.25 \pm 0.03$ ;  $0.344 \pm 0.068$  vs  $0.017 \pm 0.008$ , both  $P < 0.01$ ). Optical density and area density were significantly lower in AG group than in model group ( $0.46 \pm 0.09$  vs  $0.64 \pm 0.04$ ;  $0.159 \pm 0.021$  vs  $0.344 \pm 0.068$ , both  $P < 0.01$ ), and the portal pressure were lower in AG group than in model group.

**CONCLUSION:** Aminoguanidine may ameliorate the development of portal hypertensive gastropathy through significantly inhibiting the expression of iNOS in gastric mucosa.

**Key Words:** Aminoguanidine; Inducible nitric oxide synthase; Cirrhosis; Portal hypertensive gastropathy

Wang N, Zhan YT, Gao FS, Liu B. Effect of iNOS inhibitor on portal hypertensive gastropathy in cirrhotic rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 813-816

## 摘要

**目的:** 探讨选择性诱导型一氧化氮合酶抑制剂氨基胍(aminoguanidine, AG)对肝硬化大鼠门脉高压性胃黏膜病变的防治作用及其机制。

**方法:** 将SD大鼠30只随机分为对照组( $n = 10$ )、模型组( $n = 10$ )和AG组( $n = 10$ ), 予400 mL/L  $\text{CCl}_4$ 皮下注射12 wk建立肝硬化大鼠模型, AG组为皮下注射 $\text{CCl}_4$ 同时予AG饮用。观察比较各组大鼠胃黏膜形态及组织学变化, 应用免疫组化法检测胃黏膜诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达, 并测定胃黏膜溃疡指数、门静脉压力。

**结果:** AG组胃黏膜病变程度较模型组减轻, 溃疡指数明显低于模型组( $3.00 \pm 2.31$  vs  $10.60 \pm 3.47$ ,  $P < 0.01$ ); 模型组胃黏膜iNOS吸光度、面密度值均较对照组增高( $0.64 \pm 0.04$  vs  $0.25 \pm$

## ■背景资料

门脉高压性胃病是引起肝硬化上消化道出血的重要因素之一, 目前缺乏有效治疗手段。

## ■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科; 郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科

## ■研发前沿

NO, iNOS在PHG形成中的重要作用是近年研究热点, 其他尚包括TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、ET-1、CO等热点因子, 但其形成机制复杂, 尚未寻找到合适的治疗切入点, 本研究尚处于初步探索阶段, 缺乏大样本及更细致深入研究, 最终希望能进入临床研究阶段。

0.03;  $0.344 \pm 0.068$  vs  $0.017 \pm 0.008$ , 均 $P < 0.01$ ), AG组胃黏膜iNOS吸光度值、面密度值( $0.46 \pm 0.09$ ,  $0.159 \pm 0.021$ )均较模型组明显下降(均 $P < 0.01$ )。AG组门脉压力较模型组降低。

**结论:** AG可在一定程度上减轻门脉高压性胃黏膜病变, 其机制可能主要通过抑制胃黏膜iNOS表达。

**关键词:** 氨基胍; 诱导型一氧化氮合酶; 肝硬化; 门脉高压性胃病

王凝, 展玉涛, 高福生, 刘宾. 选择性iNOS抑制剂对肝硬化大鼠门脉高压性胃黏膜病变的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 813-816

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/813.asp>

## 0 引言

门脉高压性胃病(portal hypertensive gastropathy, PHG)是肝硬化常见并发症, 且已成为重要致死病因<sup>[1]</sup>, 目前尚缺乏有效治疗手段。近年研究表明NO是肝硬化及门脉高压形成的重要因素, 并可能参与门脉高压性胃病的形成<sup>[2]</sup>, 参与致病的NO则主要在病理状态下由诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)合成。氨基胍(aminoguanidine, AG)是近年发现的一种特异性iNOS抑制剂, 国外学者已在动物实验中观察到AG可改善门脉高压时的高动力循环状态<sup>[3-4]</sup>, 但其对门脉压力及门脉高压性胃病有无防治作用目前尚无深入研究。本实验应用CCl<sub>4</sub>制备大鼠肝硬化模型, 旨在观察AG对门脉高压性胃黏膜病变的作用及可能机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂SD大鼠30只, 体质量 $200 \pm 50$  g, 由北京同仁医院实验动物中心提供。CCl<sub>4</sub>及橄榄油购自北京化学试剂公司; 氨基胍购自美国SIGMA公司; iNOS试剂、SABC试剂盒及DAB显色剂购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组与造模:** 健康♂SD大鼠随机分为模型组( $n = 10$ ), 予sc 3 mL/kg 的400 mL/L CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液, 每周2次, 共12 wk; AG组( $n = 10$ )按模型组注射CCl<sub>4</sub>同时予氨基胍50 mg/(kg·d)饮用(即予1/1000氨基胍水溶液自由饮用<sup>[5]</sup>); 对照组( $n = 10$ )予sc橄榄油3 mL/kg, 每周2次。

**1.2.2 门脉压力测定:** 氯氨酮40 mg/kg ip麻醉后正中切口开腹, 分离门静脉主干, 以26号套管针

穿刺, 接测压管。

**1.2.3 组织标本制备及胃黏膜溃疡指数测定:** 处死后迅速取出肝脏及胃, 将胃沿大弯侧剪开, 生理盐水冲洗后展平, 观察糜烂、出血情况, 按Guth标准<sup>[6]</sup>记录溃疡指数。将部分肝脏及胃放入100 g/L甲醛中固定, 常规石蜡包埋, 连续4  $\mu$ m切片行HE染色。

**1.2.4 胃黏膜iNOS染色及图像分析:** 按照SABC试剂盒提供的操作方法进行免疫组化染色, 一抗为兔抗-iNOS IgG多克隆抗体, 工作浓度1:200, PBS为阴性对照, 二抗为生物素化山羊抗兔IgG, 最后以DAB显色(显微镜下控制反应时间约5 min), 苏木精复染, 脱水透明封片。应用医学图像分析管理系统测定iNOS阳性反应产物染色强度, 以吸光度值(A)表示; 测量阳性反应产物的面积与其窗口面积的比值, 记做面密度值(area density, AD)。每张切片随机选取10个视野, 取均值。

**统计学处理** 应用SPSS11.5统计软件进行数据分析, 检测数据以mean $\pm$ SD表示, 计量资料两组间比较采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

## 2 结果

**2.1 肝脏组织形态学改变** 模型组大鼠肝脏呈黄褐色无光泽, 体积缩小, 表面呈大小不等结节样改变, 门静脉明显增粗、迂曲, 组织学证实肝硬化形成。AG组大鼠肝脏表面呈均一细小结节, 组织学示肝纤维化程度减轻。

**2.2 门脉压力测定** 文献报道大鼠门静脉压力(portal vessel pressure, PVP)大于16 cmH<sub>2</sub>O可诊断门脉高压<sup>[7]</sup>。模型组PVP水平较对照组明显增高( $19.23 \pm 3.64$  cmH<sub>2</sub>O vs  $9.25 \pm 1.30$  cmH<sub>2</sub>O,  $P < 0.01$ ), 均存在门脉高压; AG组PVP较模型组明显降低, 有非常显著性差异( $15.21 \pm 2.10$  cmH<sub>2</sub>O vs  $19.23 \pm 3.64$  cmH<sub>2</sub>O,  $P < 0.01$ )。

**2.3 胃黏膜组织形态学观察** 对照组大鼠胃黏膜光滑; 模型组大鼠胃黏膜充血、糜烂明显, 溃疡形成伴出血, 组织学改变可见上皮细胞脱落、灶性坏死, 毛细血管扩张, 黏膜下水肿等, 黏膜下血管尤以小静脉扩张、迂曲明显; AG组大鼠胃黏膜充血、糜烂病变及组织学改变均较模型组明显减轻。胃黏膜溃疡指数测定示模型组胃黏膜溃疡指数较对照组明显增高, 有非常显著性差异( $P < 0.01$ ); AG组胃黏膜溃疡指数明显低于模型组, 有非常显著性差异( $P < 0.01$ , 表1)。

**2.4 胃黏膜iNOS表达** iNOS阳性表达细胞为胞质

## ■相关报道

国外动物实验中观察到AG对内毒素休克性肝损伤或免疫性肝损伤有一定保护作用, 并可改善肝硬化门脉高压时的高动力循环状态。

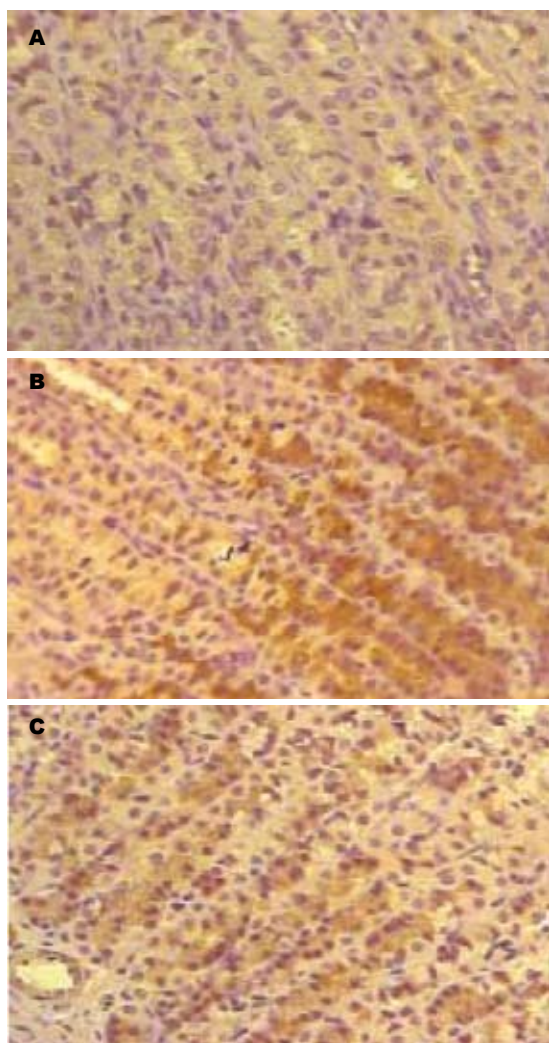


图1 大鼠胃黏膜iNOS染色(×200)。A: 对照组; B: 模型组; C: AG组。

内有棕黄色颗粒, 主要见于黏膜上皮、腺上皮和血管内皮细胞。模型组染色强度及范围均明显高于对照组( $P<0.01$ ), AG组明显低于模型组( $P<0.01$ ), 均有非常显著性差异(表1, 图1)。

### 3 讨论

本研究示肝硬化模型组大鼠均出现明显胃黏膜病变, 胃黏膜iNOS表达较对照组明显升高。在肝硬化形成过程中给予AG干预治疗, 则可见AG组大鼠胃黏膜病变程度较肝硬化模型组明显减轻, 胃黏膜iNOS表达较模型组明显降低( $P<0.01$ ), 提示AG对胃黏膜iNOS合成有明显抑制作用, 导致NO生成减少, 胃黏膜病变程度减轻; 另一方面我们也观察到AG组大鼠PVP水平较模型组降低, 肝脏纤维化程度减轻, 提示AG对降低门脉压力、改善肝脏病理变化也有一定作用, 与Tsubawa *et al*<sup>[8]</sup>报道一致。

目前研究认为NO参与了肝硬化门脉高压的

表1 各组大鼠溃疡指数、胃黏膜iNOS表达比较( $n=10$ )

分组	溃疡指数	吸光度	面密度
对照组	$0.37 \pm 0.21$	$0.25 \pm 0.03$	$0.017 \pm 0.008$
模型组	$10.60 \pm 3.47^d$	$0.63 \pm 0.04^d$	$0.344 \pm 0.068^d$
AG组	$3.00 \pm 2.31^b$	$0.44 \pm 0.06^b$	$0.159 \pm 0.021^b$

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 模型组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 对照组。

形成, 而门脉高压所致门-体分流引起内毒素血症, 内毒素刺激TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、ET-1、IL-1等细胞因子大量产生, 可刺激包括肝内及胃黏膜iNOS的表达及活性明显增强<sup>[9]</sup>, 使局部及循环血内NO合成增加, 并持续大量产生形成恶性循环。过量合成的NO一方面使胃黏膜及黏膜下血管显著扩张, 即“主动充血”; 另一方面由于门脉高压, 致胃黏膜血液回流受阻、血液淤滞, 即“被动充血”, 二者的共同作用导致胃黏膜有效循环血流量显著减少; 同时Tarnawski *et al*经实验证实<sup>[10]</sup>过量NO通过细胞毒作用可引起细胞和组织的炎性损伤; 过量NO还可破坏胃黏膜的防御机制<sup>[11]</sup>, 导致胃肠运动障碍<sup>[12]</sup>, 并可能增加胃酸分泌<sup>[13-14]</sup>等。

病理状态下产生的过量NO通过多个途径参与PHG发生, 是PHG发生中的一重要因素, 而病理状态NO主要由iNOS生成, AG正是选择性iNOS抑制剂。1992年Corbett *et al*<sup>[15]</sup>首先做了这一报道, 发现AG可在NO的合成过程中起竞争性抑制作用。结合本实验, AG明显抑制了胃黏膜iNOS表达, 从而有效减少过量NO生成, 随着NO生成减少, 即可通过改善黏膜充血、淤血状态, 减轻组织炎性损伤, 保护线粒体功能, 改善胃肠道的动力<sup>[16-17]</sup>, 减少有害物质与胃黏膜接触的时间等途径减轻PHG程度, 这可能是AG防治作用的主要机制。另一方面, 从本次实验结果看, AG可有效降低门脉压力, 减轻肝硬化程度, 我们先前的研究也证实AG可通过减少晚期糖基化终末产物减轻肝脏病变<sup>[18]</sup>。这可能是AG减轻PHG的另一机制。

总之, 在肝硬化门脉高压时胃黏膜iNOS表达显著增加, 胃黏膜病变严重; 应用AG干预后, 胃黏膜iNOS表达显著降低, 胃黏膜病变相应减轻。认为AG对门脉高压性胃病的形成有一定防治作用, 其主要机制是通过减少胃黏膜iNOS表达及NO合成, 他可能为PHG的临床治疗提供一条新的途径。而AG防治PHG可能还存在其他一些途径如降低门脉高压、改善肝功能、减轻肝

### ■应用要点

本文通过动物实验证明氨基胍可明显减轻PHG病变程度, 为临床应用提供实验依据及新的治疗思路。



## ■同行评价

本研究用选择性iNOS抑制剂对肝硬化大鼠门脉高压性胃黏膜病变的影响抑制剂对肝硬化大鼠门脉高压性胃黏膜病变的影响进行研究,对消化内科常见的肝硬化的并发症立题,选题准确,有一定的理论意义和实用价值。

硬化程度等,值得我们进一步深入研究。

## 4 参考文献

- 1 de Franchis R, Primignani M. Natural history of portal hypertension in patients with cirrhosis. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 645-663
- 2 余立凯, 尹朝礼, 唐望先, 但自力. 一氧化氮与大鼠门脉高压胃粘膜病变关系的实验研究. *同济医科大学学报* 2001; 30: 160-162
- 3 Wei CL, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Chronic administration of aminoguanidine reduces vascular nitric oxide production and attenuates liver damage in bile duct-ligated rats. *Liver Int* 2005; 25: 647-656
- 4 Lee FY, Wang SS, Tsai YT, Lin HJ, Lin HC, Chu CJ, Wu SL, Tai CC, Lee SD. Aminoguanidine corrects hyperdynamic circulation without ameliorating portal hypertension and portal hypertensive gastropathy in anesthetized portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1997; 26: 687-693
- 5 Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1991; 40: 1328-1334
- 6 Lo SK, Leung FW, Guth PH. Protection against absolute-ethanol-induced gastric antral and corpus mucosal injury. A gross and histologic study. *Dig Dis Sci* 1988; 33: 1403-1408
- 7 Schneider AR, Benz C, Adamek HE, Jakobs R, Riemann JF, Arnold JC. Minilaparoscopy versus conventional laparoscopy in the diagnosis of hepatic diseases. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 771-775
- 8 Tsugawa K, Hashizume M, Migou S, Kishihara F, Kawanaka H, Tomikawa M, Tanoue K, Sugimachi K. Role of nitric oxide and endothelin-1 in a portal hypertensive rat model. *Scand J Gastroenterol* 2000;

35: 1097-1105

- 9 Helmer KS, West SD, Shipley GL, Chang L, Cui Y, Mailman D, Mercer DW. Gastric nitric oxide synthase expression during endotoxemia: implications in mucosal defense in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 173-186
- 10 Tarnawski AS, Tomikawa M, Kawanaka H. Increased oxygen free radicals, nitrotyrosine and enhanced lipid peroxidation in portal hypertensive gastric mucosa: A key to increased susceptibility to injury. *Gastroenterology* 1999; 116: A1282
- 11 Baatar D, Kitano S, Yoshida T, Bando T, Ninomiya K, Tsuboi S. The role of nitric oxide in the inhibition of gastric epithelial proliferation in portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1999; 30: 1099-1104
- 12 Guslandi M. Nitric oxide: an ubiquitous actor in the gastrointestinal tract. *Dig Dis* 1994; 12: 28-36
- 13 越晓蓉, 秦玉兰, 齐琼. 大鼠胃伤害性刺激后胃壁一氧化氮合酶的变化. *解剖学杂志* 2001; 24: 278-282
- 14 贺启贵, 王宝林, 郭俊岗, 刘东华, 王全红, 李光. 门静脉高压性胃病病理分析. *山西医药杂志* 2004; 33: 552-556
- 15 Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR Jr, Williamson JR, McDaniel ML. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 1992; 41: 552-556
- 16 Patel S, Berrada D, Lembo A. Review of tegaserod in the treatment of irritable bowel syndrome. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5: 2369-2379
- 17 Karras PJ, Michalos A, Smith ME. The role of nitric oxide in esophageal and gastric motor function in the cat. *Gastroenterology* 1993; 104: 530A
- 18 高福生, 刘宾, 展玉涛, 史小林, 张京秀, 王凝, 丁燕, 谢新纪. 肝纤维化大鼠晚期糖基化终末产物变化及氨基胍的干预作用. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 178-182

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志中文摘要要求

**本刊讯** 本刊中文摘要必须在350字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度,研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征,如研究对象是患者,应阐明其临床表现、诊断标准,如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 $P$ ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值)。(常务副总编辑:张海宁 2009-03-18)

# ATP酶在细菌潜生体相关的IBS大鼠模型肠黏膜中的变化

裴轶劲, 黄 梅, 郭林明, 吴小兰, 刘俊康

裴轶劲, 黄梅, 郭林明, 吴小兰, 刘俊康, 中国人民解放军第三军医大学医学检验系与药学院生物波研究室 重庆市400038

重庆市科委自然科学基金计划基金资助项目, No. CSTC 2006BB5068

作者贡献分布: 此课题由裴轶劲与刘俊康设计; 研究过程由裴轶劲, 黄梅, 郭林明及吴小兰操作完成; 研究获取研究经费, 所用新试剂及分析工具由刘俊康提供; 数据分析和论文写作由裴轶劲完成。

通讯作者: 刘俊康, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学医学检验系与药学院生物波研究室. liujunkang@163.com  
电话: 023-68752190 传真: 023-68752191

收稿日期: 2009-01-05 修回日期: 2009-02-13

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-18

## Changes of intestinal mucosa ATPase in the bacterial cryptic growth cell-related IBS rat model

Yi-Jin Pei, Mei Huang, Lin-Ming Guo, Xiao-Lan Wu, Jun-Kang Liu

Yi-Jin Pei, Mei Huang, Lin-Ming Guo, Xiao-Lan Wu, Jun-Kang Liu, Bio-Wave Research Center, Department of Laboratory Medicine, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China

Supported by: the Natural Science Planning Foundation of Chongqing Science and Technology Committee, No. CST-C2006BB5068

Correspondence to: Jun-Kang Liu, Bio-Wave research center, Department of Laboratory Medicine, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China. liujunkang@163.com

Received: 2009-01-05 Revised: 2009-02-13

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To study the ATPase changes of intestinal mucosa of the bacterial cryptic growth cell (CGC)-related irritable bowel syndrome (IBS) rat model.

**METHODS:** Wistar rats were divided into normal control group and the bacterial CGC-related IBS rat model group. The ATPase activity in rat ileocecal mucosa was tested by inorganic phosphorus detection method, the energy charge (Ec) of adenosine triphosphate and the ratio of ATP to the total amount of adenylate acid pool in ileocecal mucosa cells were detected by high performance liquid chromatography method, and the

respiratory enzyme activity was tested by MTT assay method.

**RESULTS:** Compared with normal control group, in IBS rat model group intestinal mucosa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ( $22.44 \pm 5.54$  vs  $14.20 \pm 3.03$ ,  $P < 0.01$ ), and  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase ( $16.46 \pm 1.86$  vs  $10.63 \pm 1.78$ ,  $P < 0.01$ ) were significantly decreased, and ATP content was also significantly lower ( $0.96 \pm 0.18$  vs  $0.48 \pm 0.20$ ,  $P < 0.01$ ), accompanied by the respiratory enzyme activity changes ( $0.50 \pm 0.07$  vs  $0.21 \pm 0.05$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Lower ATPase activity in IBS rat ileocecal mucosa is relevant to lower energy metabolism, which may cause damage to mucosal barrier function. The results have significance on the IBS pathogenesis and treatment.

**Key Words:**  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase;  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase; Irritable bowel syndrome; Ileoceca; Mucosa

Pei YJ, Huang M, Guo LM, Wu XL, Liu JK. Changes of intestinal mucosa ATPase in the bacterial cryptic growth cell-related IBS rat model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 817-820

## 摘要

**目的:** 研究细菌潜生体相关的肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 大鼠模型肠黏膜ATP酶的变化。

**方法:** Wistar大鼠分为正常对照组和细菌潜生体相关的IBS大鼠模型组。采用无机磷法检测大鼠回盲部黏膜ATP酶活性, 高效液相色谱法检测回盲部黏膜细胞的腺苷酸能荷及ATP与总腺苷酸库比值, MTT法检测回盲部黏膜呼吸酶活性。

**结果:** 与正常对照组相比较, IBS大鼠模型组回盲部肠黏膜 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶( $22.44 \pm 5.54$  vs  $14.20 \pm 3.03$ ,  $P < 0.01$ ),  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP酶均显著下降( $16.46 \pm 1.86$  vs  $10.63 \pm 1.78$ ,  $P < 0.01$ ), ATP显著降低( $0.96 \pm 0.18$  vs  $0.48 \pm 0.20$ ,  $P < 0.01$ ), 同时呼吸酶活性显著变化( $0.50 \pm 0.07$  vs  $0.21 \pm 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

## ■背景资料

国际上对IBS的研究除继续关注5-HT受体相关的作用机制外, 出现了一部分肠黏膜屏障功能改变的研究。本文针对屏障中最为重要的细胞功能改变进行了探讨。

## ■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所药理学室

## ■研发前沿

肠黏膜屏障研究多是探讨外来因素,如肠道细菌毒素或肥大细胞等释放的过敏介质作用下屏障改变;甚少直接研究IBS中构成肠黏膜屏障之间的上皮细胞的改变,成为该领域亟待解决的问题。

**结论:** IBS大鼠回盲部黏膜ATP酶活性显著降低,与能量代谢降低相关,这可能是引起肠黏膜屏障功能受损的重要原因,与IBS病因相关。

**关键词:**  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$ ;  $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$ ; 肠易激综合征; 回盲部; 黏膜

裴轶劲, 黄梅, 郭林明, 吴小兰, 刘俊康. ATP酶在细菌潜生体相关的IBS大鼠模型肠黏膜中的变化. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 817-820

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/817.asp>

## 0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种在人群中发生率较高<sup>[1]</sup>,严重影响人们生活质量的持续存在或间歇发作的肠道功能性疾病,但其病因复杂和发病机制尚不完全清楚,造成其防治治疗的困境<sup>[2]</sup>. ATP酶存在于组织细胞及细胞器膜上,是生物膜上的重要蛋白酶,在物质运送、能量转换及信息传递等方面均有重要作用,已有研究证实在某些病理条件下<sup>[3]</sup>及机体缺氧时<sup>[4]</sup>,ATP酶会发生一系列的改变,已成为早期生理功能衰退的敏感指标.但是,迄今为止,甚少IBS动物模型肠黏膜ATP酶活性的相关报道.细菌潜生体(cryptic growth cell, CGC)相关的IBS动物模型是最近新建立的一种较为理想的IBS动物模型,已初步证实代谢缓慢,菌体延长,侵袭能力强的CGC与IBS发病相关<sup>[5]</sup>.刘俊康 *et al*<sup>[6]</sup>在前期工作中研究证实该模型的回盲部三个肠段的细胞线粒体能荷值以及ATP与总腺苷酸库比值均有明显变化.本文以该模型为研究对象,进一步研究了CGC易定植的整个回盲部肠黏膜ATP酶活性及能量代谢水平,以期阐明这些指标与IBS发病机制的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 清洁级Wistar大鼠,雌雄各半,体质量 $200 \pm 20$  g,购自中国人民解放军第三军医大学动物研究所.全价颗粒饲料饲养,自由饮水,12 h 1次明暗周期交替,室温 $24^\circ\text{C}$ ,相对湿度45%-60%.ATP酶测试试剂盒:南京建成生物工程研究所产品;头孢呋辛钠,葛兰素史克集团生产;辣椒,市售;MTT试剂, Sigma公司产品; $\text{KM}_2\text{O}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{HClO}_4$ 等均为分析纯;其余试剂染液固定剂,市售,常规配制.光学显微镜, XS2-4G, 重庆光学仪器厂;高速离心机, TGL-16G, 上海医用分析仪器厂;高效液相色谱仪, 1100Agilent, 美国安捷伦公司;酶标

仪, BioRad550, 美国BioRad公司;紫外分光光度计, Du800, 美国Beckman Culter公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细菌CGC相关的IBS模型建立:** 参照文献[5],略有修改. Wistar大鼠经适应性饲养后,随机取20只Wistar大鼠,常规饲养,作为正常对照组.另取60只Wistar大鼠, ip头孢呋辛钠2 g/L, 每2 d 1次0.2 mL, 连续3次, 然后再注射5 g/L头孢呋辛钠, 每次1 mL, 同时检测粪便细菌CGC情况<sup>[7]</sup>, 将粪便标本连续3次检测到细菌CGC的大鼠挑选出来进行辣椒液刺激实验. 7 d后给辣椒水(100 g干辣椒加水1000 mL煮至500 mL)刺激, 连续3 d灌胃总量为小鼠体质量的1/8, 此时粪便含水量经检测显著增高<sup>[8]</sup>的大鼠即为实验需要的IBS模型大鼠. 从中随机选取20只进行下一步检测。

**1.2.2 大鼠腺苷酸能荷及ATP与总腺苷酸库比值的测定:** 分别取正常对照和IBS模型大鼠各10只, 断颈处死, 立即剪取回盲部, 于冰冷的生理盐水中洗净, 取黏膜层, 立即加入9倍 $0^\circ\text{C}$ 的分离介质(0.25 mol/L蔗糖, 10 mol/L的Tris-HCl, 0.5 mol/L的EDTA)匀浆, 然后在1250 g离心8 min, 取上层液体, 5000 g离心10 min, 取沉淀; 再加入适量分离介质, 混匀后5000 g离心10 min, 弃上清液, 如此清洗数次后得到较纯的线粒体, 另取1 mL分离介质加入, 振匀, 得线粒体悬液. 从中取0.2 mL加入到0.4 mL 1.6 mol/L的 $\text{HClO}_4$ 中,  $0^\circ\text{C}$ 静置5 min后, 12500 g离心15 min, 取上清液, 加入适量的2.5 mol/L的 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 溶液至液体呈中性(pH6.5). 然后 $0^\circ\text{C}$ 静置10 min, 再次12500 g离心15 min, 取上清液, 用于高效液相色谱仪检测, 色谱条件: 检测波长254 nm, 碳十八色谱柱, 流动相为pH6.0磷酸缓冲液, 流速1 mL/min, 柱温 $37^\circ\text{C}$ , 进样量10  $\mu\text{L}$ <sup>[9]</sup>。

**1.2.3 大鼠肠黏膜 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$ ,  $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$ 活性测定:** 取正常对照和IBS模型大鼠各10只, 断颈处死, 立即取回盲部, 生理盐水中洗净, 取黏膜层, 按重量体积比加9倍生理盐水匀浆, 离心后取上清液用于检测 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$ ,  $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$ 活性。

按试剂盒说明书操作进行, 无机磷法测定 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$ ,  $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$ 活性, 以每小时每毫克组织蛋白的组织中 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$ ,  $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$ 分解ATP产生1  $\mu\text{mol/L}$ 无机磷的量为一个ATP酶活力单位即 $\mu\text{mol Pi}/(\text{mg prot}\cdot\text{h})$ , 考马斯亮蓝法测定组织蛋白含量。

**1.2.4 MTT法检测大鼠肠黏膜活性水平:** 大鼠颈椎脱臼处死, 无菌解剖, 取各组大鼠回盲部, 生

## ■创新盘点

本文研究结果表明在IBS模型大鼠肠回盲部, 其黏膜上皮细胞的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP酶}$ 和 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP酶}$ 的活性均降低, 这有助于说明IBS中肠黏膜屏障功能改变的细胞学功能基础。

表 1 大鼠回盲部黏膜线粒体能量产生情况 (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

分组	ATP	ADP	AMP	能荷(EC%)	ATP与总腺苷酸库比值(%)
正常对照组	0.96 $\pm$ 0.18	1.50 $\pm$ 0.42	0.83 $\pm$ 0.16	52.2 $\pm$ 0.02	29.6 $\pm$ 0.03
IBS模型鼠	0.48 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	1.41 $\pm$ 0.60	0.74 $\pm$ 0.30	43.8 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	17.5 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照大鼠.

理盐水中洗净内容物和表层黏液后, 分别用金属钝器刮取黏膜层, 用含100 mL/L小牛血清的RPMI 1640调整细胞浓度为 $2 \times 10^9$ /L, 按100  $\mu$ L加入96孔培养板中, 于50 mL/L CO<sub>2</sub>, 37℃培养箱中培养24 h. 用MTT法检测细胞活性, 用Bio-Rad550型酶标仪于570 nm处测吸光度A值, 结果以A<sub>570</sub>值表示.

**统计学处理** 所有计量资料用mean  $\pm$  SD表示, 使用SPSS13.0统计软件进行 $t$ 检验及方差分析结果.

## 2 结果

**2.1 大鼠回盲部黏膜线粒体能量产生情况** 根据公式: 能荷EC = (1/2ADP+ATP)/(AMP+ADP+ATP), ATP与总腺苷酸库比值 = ATP/(AMP+ADP+ATP), 计算大鼠回盲部黏膜线粒体能荷和ATP与总腺苷酸库比值. 与对照相比, IBS模型大鼠能荷值, ATP与总腺苷酸库比值, ATP均显著下降( $P < 0.01$ , 表1).

**2.2 大鼠回盲部黏膜ATP酶的变化** 与对照相比, IBS模型大鼠回盲部黏膜Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase均显著下降( $P < 0.01$ , 表2).

**2.3 大鼠回盲部黏膜细胞的呼吸酶活性** MTT检测结果显示, 正常对照组A<sub>570</sub>值与IBS模型组相比较有显著差异(0.50  $\pm$  0.07 vs 0.21  $\pm$  0.05,  $P < 0.01$ ).

## 3 讨论

本研究首次发现, 细菌CGC相关的IBS模型回盲部黏膜的Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase和Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase均有显著降低, 意味着IBS大鼠回盲部黏膜ATP酶活性受到影响, 同时肠黏膜上皮细胞呼吸酶活性低下和作为机体能量的ATP也有显著下降, 这些现象是相关的. ATP酶进行逆化学梯度离子转运, 是一种主动耗能过程, 需要水解ATP释放能量, 而IBS模型大鼠ATP下降, 能量供给匮乏, 会影响到ATP酶功能, ATP酶活性下降, 导致过多离子如Ca<sup>2+</sup>积聚在线粒体, 干扰线粒体氧化磷酸化, 线

表 2 大鼠回盲部黏膜ATP酶变化 (mean  $\pm$  SD,  $n = 10$ )

分组	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase	Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> -ATPase
正常对照组	22.44 $\pm$ 5.54	16.46 $\pm$ 1.86
IBS模型鼠	14.20 $\pm$ 3.03 <sup>b</sup>	10.63 $\pm$ 1.78 <sup>b</sup>

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 正常对照大鼠.

粒体不能正常发挥功能, 影响ATP生成, 使能量生成更趋减少, 会导致ATP酶活性进一步下降. 在IBS模型大鼠中发现ATP酶活性下降具有重要的生理意义, 对阐明IBS发生及防治有积极意义的, 我们认为早期使用对ATP酶活性有上调作用的药物, 对于及时早期治疗有帮助.

自IBS被发现以来, 对他的认识经历了许多变迁. IBS作为一种功能性疾病, 所有的症状与特定的结构, 内视镜或组织学上的异常没有相关性<sup>[2]</sup>. 然而, 近来陆续有报道证实如PD-IBS肠通透性改变, 肠黏膜屏障功能缺损<sup>[10]</sup>. IBS模型大鼠肠黏膜上皮细胞呼吸酶活性低下和ATP含量降低, 提示肠黏膜上皮细胞受到影响正是肠黏膜屏障功能缺损的决定因素. 我们分析原因在于, 细胞ATP酶活性显著下降, 细胞内外离子浓度梯度受到影响, 会造成离子流紊乱, 胞质内如Ca<sup>2+</sup>离子积累, 能量代谢水平降低, 进一步引起亚细胞结构的改变, ATP酶改变可能是肠黏膜屏障功能受损的重要原因, 提示为引发IBS症状的原因.

愈来愈多的证据显示微生物与IBS密切相关, 如IBS患者小肠细菌过度生长<sup>[11-12]</sup>, 肠道菌群失调<sup>[13-14]</sup>等, 细菌感染后部分患者易形成IBS症状<sup>[15-16]</sup>等. 在我们所用的IBS模型大鼠粪便中可持续检出有CGC, 而且回盲部有CGC的定植<sup>[5]</sup>等, 也进一步的证实微生物与IBS密切相关. ATP酶是镶嵌在脂质双分子层的特殊蛋白, 亚基暴露在细胞膜表面, 易受种种影响, 在我们所用的IBS模型大鼠CGC的定植和自溶导致内毒素产生<sup>[5]</sup>, 推测细菌内毒素的产生与该部位的ATP酶

### ■应用要点

本研究有助于围绕这两个酶作为靶位的药物开发及其治疗作用机制阐明, 也有助于阐明IBS发病的机制.



## ■同行评价

本文工作基础好,方法较先进,有较好的科学意义。

活性下降有关联,相关的实验正在进行中。

## 4 参考文献

- 1 Thompson WG, Heaton KW, Smyth GT, Smyth C. Irritable bowel syndrome in general practice: prevalence, characteristics, and referral. *Gut* 2000; 46: 78-82
- 2 Camilleri M. Treating irritable bowel syndrome: overview, perspective and future therapies. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 1237-1248
- 3 张顺斌. 原发性高血压肾病患者红细胞ATP酶活性检测的临床意义. *淮海医药* 2008; 26: 477-478
- 4 李王平, 楚东岭, 金发光. 山莨菪碱对兔海水淹溺型肺水肿组织钠-钾-ATP酶活性的影响. *中国急救医学* 2008; 28: 718-721
- 5 刘俊康, 陈杰, 吴小兰, 徐启旺. 细菌潜生体相关的IBS动物模型建立实验研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2007; 16: 243-246
- 6 刘俊康, 廖玉芳, 胡峻晨, 吴小兰, 徐启旺. 肠道细菌CGC定植及其对局部细胞活性的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1198-1201
- 7 丛延广, 刘俊康, 袁泽涛, 徐启旺. 潜生体定植的原位观察技术研究. *中国微生态杂志* 2000; 12: 70-72
- 8 Barone FC, Deegan JF, Price WJ, Fowler PJ, Fondacaro JD, Ormsbee HS 3rd. Cold-restraint stress increases rat fecal pellet output and colonic transit. *Am J Physiol* 1990; 258: G329-G337
- 9 Shofer SL, Tjeerdema RS. Effects of hypoxia and toxicant exposure on adenylate energy charge and cytosolic ADP concentrations in abalone. *Comp*

*Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1998; 119: 51-57

- 10 Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000; 47: 804-811
- 11 Lin HC. Small intestinal bacterial overgrowth: a framework for understanding irritable bowel syndrome. *JAMA* 2004; 292: 852-858
- 12 Schiller LR. Evaluation of small bowel bacterial overgrowth. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 373-377
- 13 Madden JA, Hunter JO. A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. *Br J Nutr* 2002; 88 Suppl 1: S67-S72
- 14 Gasbarrini A, Lauritano EC, Garcovich M, Sparano L, Gasbarrini G. New insights into the pathophysiology of IBS: intestinal microflora, gas production and gut motility. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2008; 12 Suppl 1: 111-117
- 15 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
- 16 Smith JL, Bayles D. Postinfectious irritable bowel syndrome: a long-term consequence of bacterial gastroenteritis. *J Food Prot* 2007; 70: 1762-1769

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 全国消化疾病诊治进展学习班在京举办

**本刊讯** 由《中华内科杂志》主办的“全国消化疾病诊治进展学习班”拟定于2009-08-08/10在北京举办。主要内容涉及: 肠易激综合征、功能性消化不良、缺血性肠病、炎症性肠病、胃食管反流病、不明原因消化道出血、慢性胰腺炎、食管胃底静脉曲张、经鼻胃镜的临床应用、食管源性胸痛及胃食管反流病与内脏高敏感、肝脏疾病的肠屏障功能改变。授课教师: 林三仁、刘新光、柯美云、钱家鸣、张澍田、周丽雅、杨云生、谢鹏雁、刘玉兰、丁士刚、吕愈敏等国内消化领域著名专家。学习期满授予学员国家级 I 类继续教育学分6分[项目编号: 2009-03-03-085(国)]。可来电、来函或电子邮件索取正式通知(请注明消化学习班)。注册费900元, 资料费100元, 食宿统一办理, 费用自理。

欢迎全国广大消化科及内科医师参加。

联系方式: 沈志伟, 100710, 北京东四西大街42号中华医学会《中华内科杂志》编辑部, shenzhw@163.com。电话: 010-85158275, 85158280; 传真: 010-85158275。

# 氩离子凝固术对兔大肠黏膜的损伤作用

窦艳, 刘庆森, 杨云生, 孟江云

窦艳, 刘庆森, 杨云生, 孟江云, 中国人民解放军总医院消化科 北京市 100853

作者贡献分布: 此课题由窦艳、刘庆森及杨云生设计; 研究过程由窦艳与刘庆森完成; 实验部分由窦艳与孟江云完成; 数据分析由窦艳完成; 论文写作由窦艳完成。

通讯作者: 窦艳, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院消化科. doud1975@126.com  
电话: 010-66937076

收稿日期: 2008-12-09 修回日期: 2009-01-24

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-18

## Mucosal injury caused by argon plasma coagulation in rabbits

Yan Dou, Qing-Sen Liu, Yun-Sheng Yang, Jiang-Yun Meng

Yan Dou, Qing-Sen Liu, Yun-Sheng Yang, Jiang-Yun Meng, Department of Gastroenterology and Hepatology, the General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Dou Yan, Department of Gastroenterology and Hepatology, the General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. doud1975@126.com

Received: 2008-12-09 Revised: 2009-01-24

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To investigate mucosal injury induced by argon plasma coagulation (APC) in rabbits.

**METHODS:** The mucosal injury of large intestine of rabbits was induced by APC with argon gas flow 2.0, 2.5, 3.0 and 4.0 L/min in two pulsed modes. Thickness of mucosa was measured by endoscopic ultra sound (EUS). Qualitative histologic analysis of each site of APC application was performed by light microscopy.

**RESULTS:** EUS showed high echo in mucosa while low echo in submucosa and muscularis propria. Depth of injury was significantly correlated with argon gas flow ( $P = 0.006$ ), power setting ( $P = 0.023$ ) and duration of pulse ( $P = 0.030$ ).

**CONCLUSION:** APC is a safe method in treatment of colon disease. The lower argon gas flow and short durations have the lowest risk of deep tissue injury.

**Key Words:** Argon plasma coagulation; Large intestine; Mucosa

Dou Y, Liu QS, Yang YS, Meng JY. Mucosal injury caused by argon plasma coagulation in rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 821-824

## 摘要

**目的:** 研究国产氩离子凝固治疗仪不同输出参数对兔大肠黏膜的损伤深度, 探讨APC治疗的安全使用范围。

**方法:** 以国产氩离子凝固治疗仪对32只新西兰白兔在体大肠黏膜进行凝固, 参数选用不同氩气流量(2.0、2.5、3.0、4.0 L/min)和不同作用方式(3 s连续方式和脉冲方式凝固)。内镜超声测量结肠壁厚度, 光学显微镜下观察组织损伤深度。

**结果:** 内镜超声扫描喷凝局部黏膜呈高回声, 其余各层回声减低。随氩气流量和输出功率增加, 大肠黏膜损伤加重( $P = 0.006$ 、 $0.023$ )。脉冲方式和连续方式对大肠壁的损伤程度有统计学差异( $P = 0.030$ ), 脉冲方式的组织损伤程度较连续方式轻。

**结论:** 氩离子凝固术对大肠黏膜损伤深度可控, 可以作为一种安全的治疗手段。

**关键词:** 氩离子凝固术; 大肠; 黏膜

窦艳, 刘庆森, 杨云生, 孟江云. 氩离子凝固术对兔大肠黏膜的损伤作用. *世界华人消化杂志* 2009; 17(8): 821-824

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/821.asp>

## 0 引言

氩离子凝固术(argon plasma coagulation, APC)是一种非接触性、以透热疗法为基础的治疗技术。目前文献报道的APC治疗消化系统疾病缺乏大宗病例报告, 参数选择多为经验性, 缺乏循证医学依据, 且以往国内外研究均使用美国或德国生产的APC治疗仪, 本研究采用国产APC治疗仪, 比较不同输出参数对兔大肠黏膜的损伤深度, 探讨APC治疗的安全使用范围, 为在临床工作中

## ■背景资料

氩离子凝固术治疗消化系统疾病缺乏循证医学依据, 且以往国内外研究均使用美国或德国生产的APC治疗仪。本研究采用国产APC治疗仪, 比较不同输出参数对兔大肠黏膜的损伤深度, 探讨APC治疗的安全使用范围, 为在临床工作中安全可靠地应用APC进行治疗提供有效的理论依据。

## ■同行评议者

董蕾, 教授, 西安交通大学第二附属医院消化内科



表 1 不同氩气流量对大肠黏膜损伤评分 (构成比)

组织损伤评分 (L/min)	40 W			80 W		
	0	1/2	3/4/5	0	1/2	3/4/5
2.0	0.69	0.31	0.00	0.31	0.66	0.03
2.5	0.66	0.31	0.03	0.34	0.38	0.28
3.0	0.41	0.50	0.09	0.16	0.32	0.52
4.0	0.00	0.63	0.37	0.00	0.28	0.72

表 2 不同输出功率对大肠黏膜损伤评分 (构成比)

组织损伤评分 (W)	脉冲方式			连续方式		
	0	1/2	3/4/5	0	1/2	3/4/5
20	0.78	0.13	0.00	0.78	0.22	0.00
30	0.72	0.28	0.00	0.69	0.31	0.00
40	0.66	0.31	0.03	0.48	0.42	0.10
50	0.56	0.34	0.09	0.38	0.48	0.14
60	0.53	0.34	0.13	0.33	0.42	0.25
70	0.44	0.38	0.19	0.24	0.38	0.38
80	0.34	0.38	0.28	0.12	0.36	0.52
90	0.30	0.38	0.32	0.08	0.27	0.65
100	0.22	0.40	0.38	0.06	0.16	0.78

#### ■应用要点

本研究虽然未对人和兔结肠管壁各层导电性进行比较, 很难以动物实验结果精确推断人类活体组织的损伤程度, 但理论上本研究的动物实验结果可以为APC作用于人活体组织产生的急性反应提供合理的理论依据。

内流而致细胞水肿。黏膜层腺细胞核呈极性改变, 考虑与氩离子流作用于组织时产生的电场有关。

随输出功率增加, APC对大肠黏膜损伤加深。在氩气流量2.5 L/min、功率 80 W连续喷凝3 s时损伤可达固有肌层。Johanns *et al*<sup>[2]</sup>采集新鲜的手术切除人结肠标本研究APC作用的组织的深度。研究结果显示, 当Pow调至75-100 W, 凝固时间2-10 s时损伤可穿透黏膜肌层; 而当Pow超过155 W及凝固时间为10 s时, 可见25%肌层表面坏死; 当凝固时间超过10 s时, 已凝固的坏死层可阻止其继续作用。大肠黏膜相对薄弱, 组织凝固后电阻升高不足以阻碍高频电流向深部传导, 所以组织损伤较深。这提示我们在临床治疗结肠病变时, 输出参数选择应偏小, 对于结肠全周病变可分次治疗, 以避免瘢痕狭窄形成<sup>[5]</sup>。

脉冲方式喷凝引起的组织损伤深度明显低于连续方式, 提示组织损伤深度随APC连续作用时间延长而增加。同样结果也出现于增加氩气流量时。Goulet *et al*<sup>[6]</sup>进行的动物试验研究证明增加输出功率和作用时间组织损伤程度加重。考虑原因为持续作用方式和增大氩气流量使单位时间内通过单位面积的电流增多, 组织接收的能量增大, 因此损伤程度加深。增加输出功率加深黏膜的损伤深度。

本研究中随氩气流量增加, 肉眼、内镜超声微探头扫描和组织学检查在所有标本未发现黏膜积气征象。经肉眼观察、内镜超声微探头扫描和组织学检查所有标本无穿孔征象。Johanns *et al*<sup>[2]</sup>进行的体外实验对胃、小肠和结肠共凝固640处(未研究食管组织), 无穿孔发生。以上结果表明APC造成的组织损伤不易引起消化系管壁穿孔, 这一结论与临床研究结果相一致。Grund *et al*<sup>[7]</sup>对102例患者进行189次治疗, 无消化系穿孔发生。在他的另外一篇报道<sup>[8]</sup>中共进行了2606例次治疗, 消化系穿孔的发生率为0.5%。这些数据与最近报道的Nd:YAG激光治疗比较, 消化系穿孔的发生率明显低于后者(1.4%, 9%)<sup>[9-12]</sup>。因此APC是一种安全性较高的治疗手段。

兔大肠管壁较人类薄, 本研究未对二者管壁各层导电性进行比较, 很难以动物实验结果精确推断人类活体组织的损伤程度, 但理论上本研究的动物实验结果可以为APC作用于人活体组织产生的急性反应提供合理的理论依据。APC的组织损伤深度可控性好, 消化系穿孔率低, 是治疗消化系黏膜病变的一种安全有效的手段。

#### 4 参考文献

- 1 Watson JP, Bennett MK, Griffin SM, Matthewson K. The tissue effect of argon plasma coagulation on esophageal and gastric mucosa. *Gastrointest Endosc*



## ■同行评价

本研究设计科学严谨,有一定说服力,结果可信,为临床应用提供了宝贵依据,同时也为国产APC的推广普及奠定了基础。

- 2000; 52: 342-345
- 2 Johanns W, Luis W, Janssen J, Kahl S, Greiner L. Argon plasma coagulation (APC) in gastroenterology: experimental and clinical experiences. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997; 9: 581-587
- 3 冯莉, 吴云林, 孙波. 氩离子凝固术对猪胃粘膜的凝固作用. *中华消化内镜杂志* 2001; 18: 164-166
- 4 Sagawa T, Takayama T, Oku T, Hayashi T, Ota H, Okamoto T, Muramatsu H, Katsuki S, Sato Y, Kato J, Niitsu Y. Argon plasma coagulation for successful treatment of early gastric cancer with intramucosal invasion. *Gut* 2003; 52: 334-339
- 5 Postgate A, Saunders B, Tjandra J, Vargo J. Argon plasma coagulation in chronic radiation proctitis. *Endoscopy* 2007; 39: 361-365
- 6 Goulet CJ, Disario JA, Emerson L, Hilden K, Holubkov R, Fang JC. In vivo evaluation of argon plasma coagulation in a porcine model. *Gastrointest Endosc* 2007; 65: 457-462
- 7 Grund KE, Storek D, Farin G. Endoscopic argon plasma coagulation (APC) first clinical experiences in flexible endoscopy. *Endosc Surg Allied Technol* 1994; 2: 42-46
- 8 Grund KE, Zindel C, Farin G. [Argon plasma coagulation through a flexible endoscope. Evaluation of a new therapeutic method after 1606 uses] *Dtsch Med Wochenschr* 1997; 122: 432-438
- 9 Bown SG, Hawes R, Matthewson K, Swain CP, Barr H, Boulos PB, Clark CG. Endoscopic laser palliation for advanced malignant dysphagia. *Gut* 1987; 28: 799-807
- 10 Shmueli E, Myszor MF, Burke D, Record CO, Matthewson K. Limitations of laser treatment for malignant dysphagia. *Br J Surg* 1992; 79: 778-780
- 11 Carter R, Smith JS, Anderson JR. Palliation of malignant dysphagia using the Nd:YAG laser. *World J Surg* 1993; 17: 608-613; discussion 614
- 12 Maciel J, Barbosa J, Leal AS. Nd-YAG laser as a palliative treatment for malignant dysphagia. *Eur J Surg Oncol* 1996; 22: 69-73

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009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, 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496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2009-03-18)

# 胃镜及内镜超声在食管乳头状瘤诊治中的价值

黄焕军, 郑要初, 程斌, 杨玉珍, 王南下

黄焕军, 郑要初, 程斌, 杨玉珍, 王南下, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

作者贡献分布: 程斌、郑要初及黄焕军对此文所作贡献均等; 此课题由程斌设计; 研究过程由黄焕军、郑要初、程斌、杨玉珍及王南下操作完成; 本文写作由郑要初、黄焕军及程斌完成。

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

b.cheng@tjh.tjmu.edu.cn

电话: 027-83663612 传真: 027-83646605

收稿日期: 2008-12-22 修回日期: 2009-02-21

接受日期: 2009-02-23 在线出版日期: 2009-03-18

## Values of gastroscopy and endoscopic ultrasonography in diagnosis and treatment of esophageal papilloma

Huan-Jun Huang, Yao-Chu Zheng, Bin Cheng, Yu-Zhen Yang, Nan-Xia Wang

Huan-Jun Huang, Yao-Chu Zheng, Bin Cheng, Yu-Zhen Yang, Nan-Xia Wang, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Bin Cheng, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. b.cheng@tjh.tjmu.edu.cn  
Received: 2008-12-22 Revised: 2009-02-21

Accepted: 2009-02-23 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To explore the value of gastroscopy and endoscopic ultrasonography in diagnosis and treatment of esophageal papilloma.

**METHODS:** Forty nine cases with esophageal papilloma confirmed by pathological examination underwent gastroscopy and 24 of them underwent endoscopic ultrasonography. Then their manifestations of gastroscopy and endoscopic ultrasonography as well as the relationship between the pathologic and clinical characteristics were analyzed.

**RESULTS:** On gastroscopy, most lesions of EP cases were located at the middle or distal esophagus (89.8%), assuming feather-like or corpora mammillaria-like bulge, with floccular or fine granular-like surface and grayish-white color,

and most of the EP was single with diameter ranging from 0.3-0.6 cm. Of 24 cases undergoing endoscopic ultrasonography, 17 were diagnosed as EP (70.8%), and 6 were diagnosed as inflammatory proliferation or polypus (25%). The classic endosonographic characteristics were even iso-echoic with clear boundary originating from mucosa layer, protruding into the lumen.

**CONCLUSION:** Esophageal papilloma is well displayed on endoscopic ultrasonography, which could be used to determine indications of endoscopy.

**Key Words:** Esophageal papilloma; Gastroscopy; Endoscopic ultrasonography; Pathology

Huang HJ, Zheng YC, Cheng B, Yang YZ, Wang NX. Values of gastroscopy and endoscopic ultrasonography in diagnosis and treatment of esophageal papilloma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 825-828

## 摘要

**目的:** 探讨胃镜及内镜超声在食管乳头状瘤(esophageal papillomas, EP)诊治中的价值。

**方法:** 我院消化内镜中心2003-07/2008-10经内镜电切或活检标本病理证实EP患者49例, 均行胃镜检查, 其中24例行内镜超声检查, 分析其常规胃镜表现、内镜超声声像图特征及其与病理和临床的关系。

**结果:** 49例行胃镜检查的EP病例多位于食管中下段(占89.8%), 呈羽毛状或乳头状隆起, 表面呈絮状或细颗粒状, 色灰白, 多为单发, 大小0.3-0.6 cm; 24例行超声内镜检查的EP患者中有17例EUS诊断为食管乳头状瘤(占70.8%), 6例EUS诊断为炎性增生或息肉(25%); 其典型EUS声像图特征为起源于黏膜层的均匀等回声, 边界清晰, 向腔内突出。

**结论:** EUS能清晰显示EP起源层次和侵犯深度, 可用于判断其是否适合内镜下治疗。

**关键词:** 食管乳头状瘤; 胃镜检查术; 内镜超声检查术; 病理

## ■背景资料

食管乳头状瘤(EP)是起源于食管鳞状上皮的息肉样肿瘤, 有复发可能性, 可被视作癌前病变。因而探讨食管乳头状瘤的内镜、特别是内镜超声特征与病理的关系, 有助于其临床诊断与鉴别诊断, 指导治疗。

## ■同行评议者

郭晓钟, 教授, 中国人民解放军沈阳军区总医院消化内科; 程英升, 教授, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

## ■研究前沿

食管乳头状瘤临床上较少见且缺乏特异性症状,往往行内镜检查时偶然发现。近年来随着内镜技术的广泛应用和不断发展,检出率逐渐提高,其内镜下具有一定特点,但其内镜超声特征尚未见报道。

黄焕军, 郑要初, 程斌, 杨玉珍, 王南下. 胃镜及内镜超声在食管乳头状瘤诊治中的价值. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 825-828

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/825.asp>

## 0 引言

食管乳头状瘤(esophageal papillomas, EP)是一种起源于食管鳞状上皮的息肉样肿瘤<sup>[1]</sup>。临床上较少见且缺乏特异性症状,往往行常规内镜检查时偶然发现。近年来随着内镜技术的广泛应用和不断发展,检出率逐渐提高。由于EP有复发可能性,且与食管癌有一定关系,可被视作癌前病变,而且在EP病例中可伴发其他部位的恶性肿瘤。因而,EP逐渐受到关注。我们拟通过分析49例EP的常规内镜、内镜超声(endoscopic ultrasonography, EUS)及病理特征,探讨内镜超声在EP诊断和治疗中的价值。

## 1 材料和方法

1.1 材料 我院消化内镜中心2003-07/2008-10共行胃镜检查109 948例,经内镜电切或活检标本病理证实EP 49例,占同期胃镜检查的0.045%。其中24例行超声内镜检查。49例EP病例中,男18例,女31例。平均年龄为46.7(23-75)岁,高发年龄段为40-60岁,占63.3%。

1.2 方法 胃镜采用Olympus GF240、260及1T240, EUS采用Olympus GF-UM2000型超声内镜诊断仪与UM-2R、UM3R和UM-BS20-26微探头,探头频率为12或20 MHz。食管病灶均采用微探头接触法加注水法显示。全部病例均行多倍放大图像比较观察,由三位至少有三年以上EUS操作经验的专家完成。

## 2 结果

2.1 临床表现 49例EP病例中38例患者有上腹部疼痛不适、嗝气、反酸等症状;烧心及胸骨后疼痛者9例;吞咽困难或不适者10例;黑便1例;口臭1例。本组病例伴发中下段食管炎者16例,最多见。其他伴发病还有:慢性糜烂性胃炎12例、慢性萎缩性胃炎3例、胃溃疡1例、十二指肠溃疡3例、十二指肠球炎5例、Barrett食管2例。

2.2 电子胃镜特征 本组49例EP病例行常规胃镜检查术(图1),结果显示:位于食管上段5例(10.2%)、中段21例(42.9%)、下段23例(46.9%);40例呈球羽毛状隆起、5例呈乳头状隆起、4例呈扁平或柱状隆起;40例表面呈絮状或细颗粒状、6例表面光滑、3例表面糜烂;43例呈灰白

色或乳白色、6例呈粉红色;病变直径最大1.8 cm,最小0.2 cm,多数在0.3-0.6 cm;43例亚蒂,注水后呈漂浮状,6例无蒂;45例为单发、4例为多发(3例为2枚,1例为3枚);42例活检质地柔软,弹性尚可、7例质地中等。

2.3 EP病例的EUS声像图特征 EUS能显示消化系统管壁的层次结构,根据管壁层次结构的完整性、病灶的起源及大小、回声、形态和边缘等声像学特征,EUS可对食管隆起性病变作出相当准确的判断(图2)。本组49例EP病例中24例患者行EUS检查。在24例行EUS检查的患者中有17例超声诊断为食管乳头状瘤(70.8%),4例诊断为息肉(16.7%),2例诊断为炎性增生(8.3%),1例诊断为平滑肌瘤(4.2%)。

17例与病理诊断相吻合的EP病例EUS声像图特征为:17例均起源于第1层;均呈等回声,内部回声均匀;边界均清晰;向腔内突出。7例与病理诊断不吻合的病例中6例起源于第1层,其中4例为强回声或稍高回声,内部回声不均匀(判断为息肉),2例为等回声,内部回声欠均匀(判断为炎性增生),边界均清晰且向腔内突出;1例EUS显示起源于第2层呈不均匀低回声者判断为平滑肌瘤。

2.4 EP病例的病理特点 本组49例EP患者生长方式以外生型最多(37例),其次为内生型(9例),峰型较少见(3例);典型病理表现为表层的鳞状上皮呈乳头状增生,中央为纤维血管组成的中心轴,上皮细胞大多分化成熟,常伴上皮角化不全(图3);另外EP病理常出现挖空细胞,而峰型EP往往无挖空细胞存在,间质中可有中性粒细胞、伊红细胞等浸润;本组49例食管乳头状瘤患者均无恶变,仅3例呈轻度不典型增生。

## 3 讨论

EP是来源于上皮组织的食管息肉样肿瘤,呈外向性生长,一般较局限,无突破基层向深层浸润生长的现象。于1959年由Adler *et al*首先报道,并经组织学证实<sup>[1]</sup>。20世纪70年代前多在尸检中发现,70年代后随着内镜技术的发展,多为内镜下发现。文献报道该病发病率为0.01%-0.45%<sup>[2-6]</sup>,我院检出率为0.045%与文献报道一致。随着内镜技术的发展和对该病的认识逐渐增强,EP检出率有逐年增多的趋势。男女均可发病,国外文献报道男性发病明显多于女性<sup>[7]</sup>,但从本组病例看女性(31例)发病率高于男性(18例)。食管乳头状瘤可发生于任何年龄组,40-60岁为高发年



图 1 EP胃镜图像.

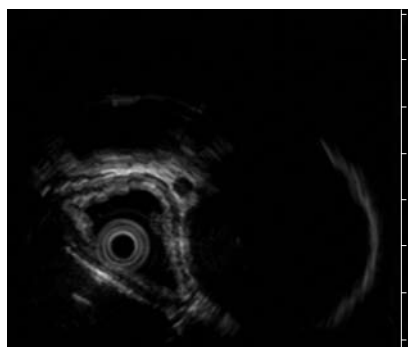


图 2 EP超声内镜声像图.

龄段, 本组病例平均年龄为46.7岁, 高发年龄段为40-60岁, 占63.3%. EP起病隐袭, 多无特异性临床表现, 少数患者可有胸骨后疼痛, 吞咽困难, 本组49例患者无伴发恶性肿瘤病例.

食管乳头状瘤可发生于食管的任何部位, 但以中、下段多见, 本组病例位于食管上段者仅占10.2%、而位于中下段者达89.8%, 这可能与食管中下段更易受食管反流液刺激引起黏膜损伤有关. 食管乳头状瘤大部分呈羽毛状隆起、少数呈乳头状隆起、扁平或柱状隆起; 表面呈絮状或细颗粒状, 颜色多为乳白色或灰白色, 边界清晰, 直径多为0.3-0.6 cm, 多单发. 内镜下应与食管糖原性棘皮病、黏膜白斑、寻常疣、疣状鳞癌等相鉴别. 虽然内镜下食管乳头状瘤有一定特点, 但单靠常规胃镜诊断并不可靠. 活检仍是诊断本病的关键.

常规胃镜检查能有效发现食管和胃的隆起性病变, 但仅能观察病灶表面的形态学特征. EUS能清晰显示食管、胃壁的层次结构, 从内至外5层依次为: 第1层高回声带, 相当于黏膜层及在黏膜表面产生的界面波; 第2层低回声带, 相当于黏膜深层与黏膜肌层; 第3层高回声带相当于黏膜下层; 第4层低回声带相当于固有肌层; 第5层高回声带相当于浆膜层及浆膜外组织中产生的界面波. 因此, EUS检查能准确判断食管隆起性病变的起源层次及生长方式<sup>[8-12]</sup>, 同时还

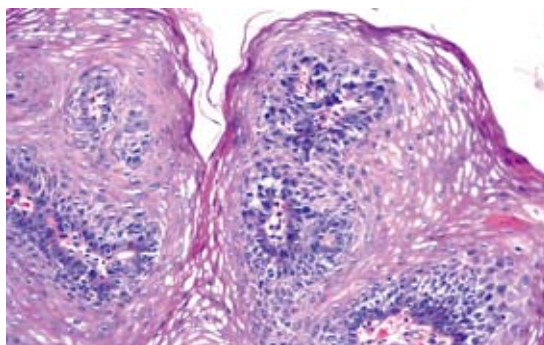


图 3 EP病理特征(HE × 100).

能根据病变回声、大小、边界等声像图特征初步判断其性质, 从而确定其是否适合内镜下治疗. 本组行超声内镜检查的24例EP患者中有17例与病理诊断相吻合: 均起源于第1层; 均呈等回声, 内部回声均匀; 边界清晰; 向腔内突出. 7例与病理诊断不吻合的病例中6例起源于第1层, 其中4例呈不均匀强回声者判断为息肉; 2例呈欠均匀等回声者判断为炎性增生, 边界均清晰且向腔内突出; 仅1例EUS显示起源于第2层呈不均匀低回声者判断为平滑肌瘤. 因此, 我们认为食管EP典型的EUS声像图特征为起源于第1层的均匀等回声, 边界清晰; 向腔内突出. 部分起源于第1层的非均匀强回声具有与息肉和炎性增生相似的声像图特征, 易与息肉混淆, 需结合胃镜图像及活检结果进行鉴别. 此外, EUS可清晰地显示食管乳头状瘤的起源层次和侵犯深度, 故可用于判断是否适合行内镜下治疗.

食管乳头状瘤病因不明, 发病机制亦有争议, 目前的研究认为与黏膜损伤和人类乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染有关<sup>[13]</sup>. 本组病例临床表现与反流性食管炎相似, 伴随疾病中以反流性食管炎最常见, 表明黏膜损伤后再生在食管乳头状瘤发病中起着重要的作用. 由于HPV与人类鳞状上皮有高度亲和性以及而EP光镜下部分上皮内有挖空样细胞改变的特点, 所以有学者认为食管乳头状瘤HPV感染有关<sup>[14-16]</sup>. 但目前多数学者认为食管乳头状瘤发病原因是多因素共同作用的结果. 多数认为有害化学物质附着食管黏膜和其他慢性刺激的存在, 激活HPV感染共同作用引起食管乳头状瘤的发生, 然而一些文献报道食管乳头状瘤的HPV检出率并不一致, 甚至有人检查HPV阴性<sup>[7]</sup>. 因此, HPV与食管乳头状瘤的确切关系有待进一步研究.

#### 4 参考文献

- 1 Adler RH, Carberry DM, Ross CA. Papilloma of the

#### ■应用要点

本文的研究结果有助于提高内镜医师对食管乳头状瘤的认识, 并为EP的诊断和后续治疗提供指导.



## ■同行评价

本文较为系统地描述了食管乳头状瘤的内镜、超声内镜及病理学检查特征,并据此提出了常规内镜检查结合病理活检及超声内镜检查的诊断策略,有助于提高食管乳头状瘤的检出率,并对处理方式提供借鉴意义,具有临床指导价值,值得进一步研究探讨。

- esophagus: association with hiatal hernia. *J Thorac Surg* 1959; 37: 625-635
- 2 Mosca S, Manes G, Monaco R, Bellomo PF, Bottino V, Balzano A. Squamous papilloma of the esophagus: long-term follow up. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 857-861
- 3 Takeshita K, Murata S, Mitsufuji S, Wakabayashi N, Kataoka K, Tsuchihashi Y, Okanoue T. Clinicopathological characteristics of esophageal squamous papillomas in Japanese patients--with comparison of findings from Western countries. *Acta Histochem Cytochem* 2006; 39: 23-30
- 4 Orłowska J, Jarosz D, Gugulski A, Pachlewski J, Butruk E. Squamous cell papillomas of the esophagus: report of 20 cases and literature review. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 434-437
- 5 Szántó I, Szentirmay Z, Banai J, Nagy P, Gonda G, Vörös A, Kiss J, Bajtai A. [Squamous papilloma of the esophagus. Clinical and pathological observations based on 172 papillomas in 155 patients] *Oro Hetil* 2005; 146: 547-552
- 6 Kao PC, Vecchio JA, Schned LM, Blaszyk H. Esophageal squamous papillomatosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 1233-1237
- 7 Carr NJ, Monihan JM, Sobin LH. Squamous cell papilloma of the esophagus: a clinicopathologic and follow-up study of 25 cases. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 245-248
- 8 Varas Lorenzo MJ, Maluenda MD, Pou JM, Abad R, Turró J, Espinós JC. [The value of endoscopic ultrasonography in the study of submucosal tumors of the digestive tract] *Gastroenterol Hepatol* 1998; 21: 121-124
- 9 Argüello L. Endoscopic ultrasonography in submucosal lesions and extrinsic compressions of the gastrointestinal tract. *Minerva Med* 2007; 98: 389-393
- 10 Săftoiu A, Vilmann P, Ciurea T. Utility of endoscopic ultrasound for the diagnosis and treatment of submucosal tumors of the upper gastrointestinal tract. *Rom J Gastroenterol* 2003; 12: 215-229
- 11 Oğuz D, Filik L, Parlak E, Dişibeyaz S, Çiçek B, Kaçar S, Aydoğ G, Sahin B. Accuracy of endoscopic ultrasonography in upper gastrointestinal submucosal lesions. *Turk J Gastroenterol* 2004; 15: 82-85
- 12 Shen EF, Arnott ID, Plevris J, Penman ID. Endoscopic ultrasonography in the diagnosis and management of suspected upper gastrointestinal submucosal tumours. *Br J Surg* 2002; 89: 231-235
- 13 Quitadamo M, Benson J. Squamous papilloma of the esophagus: a case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 194-201
- 14 Kato H, Orito E, Yoshinouchi T, Ueda R, Koizumi T, Yoshinouchi M, Mizokami M. Regression of esophageal papillomatous polyposis caused by high-risk type human papilloma virus. *J Gastroenterol* 2003; 38: 579-583
- 15 Shen ZY, Xu LY, Li EM, Cai WJ, Shen J, Chen MH, Cen S, Tsao SW, Zeng Y. The multistage process of carcinogenesis in human esophageal epithelial cells induced by human papillomavirus. *Oncol Rep* 2004; 11: 647-654
- 16 Syrjänen K, Pyrhönen S, Aukee S, Koskela E. Squamous cell papilloma of the esophagus: a tumour probably caused by human papilloma virus (HPV). *Diagn Histopathol* 1982; 5: 291-296

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## WJG 荣获 2007 年“中国百种杰出学术期刊” 和 2008 年中国国际化精品科技期刊

**本刊讯** 由中国科学技术信息研究所主办的中国科技论文统计结果发布会于2008-12-09在北京国际会议中心召开,世界胃肠病学主编马连生和编辑部主任程剑侠参加此项发布会。本次会议介绍了中国精品科技期刊服务与保障系统,中国科技论文研究项目进展及精品科技期刊遴选,百篇最具影响学术论文评选,世界科技产出趋势和利用科学计量学工具分析领域发展趋势以及发布了中国科技论文统计结果。根据2007年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD2007)统计结果,WJG荣获2007年度“中国百种杰出学术期刊”称号,同时被选入2008年中国国际化精品科技期刊,中国精品科技期刊包括23种中国国际化精品期刊和301种中国精品科技期刊。(编辑:程剑侠 2009-03-18)

# 不同类型胃食管反流病发病机制的差异

张灵云, 蓝宇, 王玘

张灵云, 蓝宇, 王玘, 积水潭医院消化科 北京市 100035  
作者贡献分布: 此课题由蓝宇设计; 操作过程由张灵云与王玘操作完成; 数据分析及论文写作由张灵云与蓝宇完成.  
通讯作者: 蓝宇, 100035, 北京市, 积水潭医院消化科.  
lanyu-mail@sohu.com  
电话: 010-58517177  
收稿日期: 2009-01-01 修回日期: 2009-02-15  
接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-18

## Etiological differences for different types of gastroesophageal reflux disease

Ling-Yun Zhang, Yu Lan, Qi Wang

Ling-Yun Zhang, Yu Lan, Qi Wang, Department of Gastroenterology, Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China  
Correspondence to: Yu Lan, Department of Gastroenterology, Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China. lanyu-mail@sohu.com  
Received: 2009-01-01 Revised: 2009-02-15  
Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the differences in etiology for reflux esophagitis (RE), non-erosive reflux disease (NERD) and Barrett's esophagus (BE).

**METHODS:** A total of 113 cases with gastroesophageal reflux disease (GERD) were divided into three groups according to endoscopic manifestations and pathological features. Endoscopic manifestations, indexes of the esophageal manometry and intraesophageal pH monitoring in 24 h, and incidences of hiatal herniae (HH) were observed and compared in all the patients.

**RESULTS:** Lower esophageal sphincter pressure (LESP) was noted in reflux esophagitis (RE) group than either NERD group or BE group, but no statistical significance was observed. The amplitudes of esophageal body contraction in RE patients were lower than these in NERD patients ( $P < 0.05$ ). Compared with the other two groups, ineffective esophageal movements (IEMs) in RE patients were increased significantly ( $P < 0.05$ ). DeMeester scores in RE, NERD and BE patients were 90.2, 55.2 and 48.8, respectively ( $P < 0.05$ ).

Severe acid exposure was common in RE patients (43%), and light acid exposure was common in NERD patients (45.8%). The incidences of HH in RE, NERD and BE patients were 50%, 14.6%, 25.7%, respectively. It was higher in RE patients ( $P = 0.003$ ).

**CONCLUSION:** The differences of dysfunction of the LES and esophageal body, and also the differences of severity of acid exposure might be the most important reasons for different mucosa injuries among the three groups of GERD patients.

**Key Words:** Gastroesophageal reflux disease; Group; Pathophysiologic mechanism; Esophageal manometry; pH monitoring

Zhang LY, Lan Y, Wang Q. Etiological differences for different types of gastroesophageal reflux disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 829-833

## 摘要

**目的:** 比较不同类型胃食管反流病(GERD), 即反流性食管炎(RE)、非糜烂性反流病(NERD)和Barrett食管(BE)发病机制的差异。

**方法:** 113例GERD患者, 根据内镜下表现及病理情况分为RE、NERD、BE三组, 比较三组患者内镜下表现、食管测压和24 h pH监测指标、合并食管裂孔疝(HH)情况的差异。

**结果:** RE组较NERD组与BE组下食管括约肌压力减低, 但无统计学差异。食管体部各段的收缩波幅比较, RE组减低最明显, NERD组减低最少, 两组比较 $P < 0.05$ ; 无效食管运动比较, RE组较另两组明显增多( $P < 0.05$ )。RE、NERD、BE组24 h食管pH监测的DeMeester计分分别为90.2、55.2、48.8; RE组以重度酸暴露多见(43%), 反流总时间阳性率较高; NERD组以轻度酸暴露多见(45.8%), 反流频率阳性率较高; BE组以长反流时间阳性率较高。HH在RE、NERD、BE组中的检出率分别为50%、14.6%、25.7%( $P = 0.003$ )。

**结论:** 下食管括约肌及食管体部运动功能受

## ■背景资料

近年来, 随着人们生活方式的改变, 胃食管反流病的发病率逐年升高, 严重影响了人们的生活质量, 目前对其分型、发病机制以及干预治疗等方面的研究越来越受到大家的关注。

## ■同行评议者

施诚仁, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院小儿外科

## ■研发前沿

胃食管反流病可分为三种不同的类型,三者临床症状相似,但食管黏膜损伤及对抑酸等治疗的反应不同,推测其原因在于三者间发病机制不完全相同,但这种差异尚不明确。

损程度、酸反流情况的差异可能是造成三种不同类型GERD食管黏膜损伤表现不同的主要原因。

**关键词:** 胃食管反流病; 分型; 发病机制; 食管测压; pH监测

张灵云, 蓝宇, 王纪. 不同类型胃食管反流病发病机制的差异. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 829-833  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/829.asp>

## 0 引言

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)可以分为三种相互独立的类型<sup>[1]</sup>: 反流性食管炎(reflux esophagitis, RE)、非糜烂性反流病(non-erosive reflux disease, NERD)和Barrett食管(Barrett's esophagus, BE). 三者临床症状相似,但食管黏膜损伤的表现差别很大,对药物等治疗的反应也不完全相同,推测三者发病机制上存在一定差异. 近年来关于RE与NERD患者发病机制比较的研究较多,但结论并不完全一致;而RE、NERD与BE三者发病机制的比较则鲜见报道。

本研究通过分析于我院就诊的113例GERD患者的食管测压及24 h pH监测结果、是否合并食管裂孔疝(hiatus hernia, HH)等相关数据,探讨不同类型GERD患者在发病机制上的异同。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 113例受试对象均来自我院门诊就诊及住院的患者,其中男47例,女66例,年龄20-81(平均 $55.7 \pm 13.06$ )岁. 所有患者均接受内镜检查、食管测压及24 h食管pH监测. 根据《中国胃食管反流病共识意见》<sup>[2]</sup>的定义,将受试对象分为三组: 内镜下见食管远段黏膜破损者归入RE组( $n = 30$ ); 内镜见食管远段的鳞状上皮被柱状上皮取代或活检病理证实为肠化为幽门腺样柱状上皮者归入BE组( $n = 35$ ); 内镜下未见明显食管黏膜损伤,而24 h食管pH监测阳性者归入NERD组( $n = 48$ ). 三组患者的年龄及性别分布无明显差异。

### 1.2 方法

**1.2.1 内镜检查:** 胃镜检查应用Olympus EVIS-XQ260/240电子胃镜,对内镜下诊断为Barrett食管患者进行活检病理检查以确定诊断. HH的诊断标准为内镜下见到齿状线上移 $\geq 2$  cm<sup>[3]</sup>。

**1.2.2 食管测压:** 采用美国Sandhill公司的BioLAB床边压力检测系统及相应的计算机

分析应用软件. 采用定点牵拉法测定下食管括约肌压力(low-esophageal sphincter pressure, LESP)及长度的(low-esophageal sphincter length, LESL). 将压力传感器分别置于下食管括约肌(low-esophageal sphincter, LES)上方5、10、15 cm(远段食管)及上食管括约肌(upper-esophageal sphincter, UES)下方1、6、8 cm处(近段食管),嘱患者进行6次湿吞咽,每次咽水5 mL,间隔30 s,记录食管远段的收缩波幅及时限,计算食管体部收缩的传导速度。

根据吞咽时食管体部的收缩波幅、波形及收缩传导速度等,将每次吞咽分别定义为有效蠕动及无效食管运动(infective esophageal movement, IEM). 有效蠕动时<sup>[4]</sup>,蠕动波幅在近段食管 $\geq 12$  mmHg,在远段食管 $\geq 30$  mmHg,但均小于180 mmHg;收缩传导速度小于8 cm/s. IEM可分为以下类型<sup>[5]</sup>: (1)低幅收缩:收缩波幅在近段食管10-12 mmHg,远段食管12-30 mmHg; (2)收缩缺失与脱落:至少一个检测位置但并非所有位置的收缩波幅 $< 10$  mmHg; (3)无收缩:吞咽时各位置未检测到收缩波或收缩波幅均 $< 10$  mmHg; (4)非推进性收缩:包括同步收缩(收缩传导速度 $\geq 8$  cm/s)及反向收缩(逆收缩)。

**1.2.3 24 h食管内pH监测:** 采用美国Sandhill公司的BioSTAR 24 h pH监测系统及相应的计算机分析应用软件. 检查时将pH电极置于LES上方5 cm处;检查过程中嘱患者尽量保持原有的生活习惯,正常作息、运动;并禁食可能会影响到测试结果的可乐和酸性食物、饮料等。

观察指标包括24 h内食管pH $< 4$ 的总时间%,立位和卧位pH $< 4$ 的时间%,pH $< 4$ 的反流总次数,最长反流持续时间及反流持续时间大于5 min的次数;Demeester计分为上述各监测指标的综合评估, $\leq 14.72$ 为食管酸暴露阴性<sup>[6]</sup>. 根据患者24 h食管pH监测时各观察指标是否正常,将每组患者中某一指标异常的患者的例数与该组患者的总人数进行比较,所得比值作为该指标在该组患者中的阳性率,分析三组患者酸暴露的特点;根据Demeester计分值得患者酸暴露程度进行分级:14.72-50分为轻度酸暴露,51-100分为中度酸暴露, $> 100$ 分为重度酸暴露。

**统计学处理** 正态分布与非正态分布的计量资料分别采用单因素方差分析与非参数检验,计数资料采用卡方检验. 所有数据应用SPSS13.0进行分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

## ■相关报道

梁学亚 *et al*曾对反流性食管炎与非糜烂性反流病患者的食管动力及酸暴露情况进行了比较,结果发现二者间酸暴露,食管体部压力等指标无明显差异。

表 1 GERD患者食管收缩波幅比较 (mean  $\pm$  SD, mmHg)

分组	<sup>1</sup> U1	<sup>1</sup> U6	<sup>1</sup> U8	<sup>2</sup> L15	<sup>2</sup> L10	<sup>2</sup> L5
RE	50.2 $\pm$ 28.36	27.4 $\pm$ 8.54	28.2 $\pm$ 13.03	43.6 $\pm$ 24.77	53.8 $\pm$ 34.41	52.6 $\pm$ 37.88
NERD	65.1 $\pm$ 32.24	38.1 $\pm$ 24.53 <sup>a</sup>	42.6 $\pm$ 25.31 <sup>a</sup>	57.9 $\pm$ 30.12 <sup>a</sup>	70.2 $\pm$ 35.90 <sup>a</sup>	77.3 $\pm$ 46.69 <sup>a</sup>
BE	53.4 $\pm$ 31.64	36.3 $\pm$ 15.60	37.5 $\pm$ 23.21	58.4 $\pm$ 31.53 <sup>a</sup>	65.2 $\pm$ 27.37	62.1 $\pm$ 29.85
合计	57.4 $\pm$ 31.47	34.8 $\pm$ 19.16	37.1 $\pm$ 22.53	54.3 $\pm$ 29.73	64.3 $\pm$ 33.51	65.9 $\pm$ 40.73

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs RE组; <sup>1</sup>: U1、U6、U8分别表示UES下方1、6、8 cm处; <sup>2</sup>: L5、L10、L15分别表示LES上方5、10、15 cm处。

表 2 GERD患者各段食管吞咽时的收缩波形的比较

诊断	食管区域	吞咽总次数	有效蠕动(%)	低幅收缩(%)	收缩缺失或脱落(%)	无收缩(%)	非推进性收缩(%)
RE	近段	97	52.6 <sup>a</sup>	4.1	35.1 <sup>a</sup>	4.1	4.1
	远段	99	33.3 <sup>ac</sup>	40.4 <sup>ac</sup>	14.1	10.1	2.1
NERD	近段	136	70.6	3.7	13.2	3.7	8.8
	远段	145	55.9	24.1	9.7	8.3	2.1
BE	近段	137	52.6 <sup>a</sup>	5.8	33.6 <sup>a</sup>	5.8	2.2 <sup>a</sup>
	远段	135	52.6	22.2	9.6	10.4	5.2
合计	近段	370	59.2	4.6	26.5	4.6	5.1
	远段	379	48.8	27.7	10.8	9.5	3.2

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs NERD; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs BE组。

## 2 结果

**2.1 GERD患者下食管括约肌功能** RE组、NERD组及BE组患者的LESP分别为10.8  $\pm$  4.55 mmHg、13.3  $\pm$  5.88 mmHg及13.3  $\pm$  5.67 mmHg, RE组较另外两组有明显减低趋势, 但无统计学差异( $P = 0.054$ )。RE组的LES<sub>L</sub>为1.9  $\pm$  0.64 cm, 较NERD组(2.2  $\pm$  0.76 cm)及BE组(2.0  $\pm$  0.60 cm)也有减低趋势( $P > 0.05$ )。

### 2.2 GERD患者食管体部运动

**2.2.1 食管体部收缩波幅:** RE组的收缩波幅明显减低, BE组减低也较明显, NERD组的收缩波幅减低最少; RE组与NERD组有统计学差异(表1)。

**2.2.2 食管体部的收缩波形态:** RE组IEM明显增多, 主要表现为近段食管的收缩缺失与脱落及远段食管低幅收缩; NERD组的有效蠕动明显多于RE及BE组( $P < 0.05$ , 表2)。

**2.3 GERD患者酸暴露情况** GERD患者的平均DeMeester计分为60.9分; RE、NERD、BE组患者的DeMeester计分别为90.2分、55.2分、48.8分。RE组、BE组、NERD组中分别以重度(52%)、中度(46%)、轻度(46%)酸暴露所占比例较多。

三组患者pH监测的各项指标比较, RE组总反流时间%及反流的最长时间异常的阳性率均

为80%; NERD组立位反流时间%与反流的总次数异常的阳性率分别为89%及87%; BE组反流的最长时间和反流大于5 min的次数异常的阳性率分别为74%及71%。

**2.4 GERD患者合并HH情况** HH在GERD患者中的检出率为27.4%; 其中在RE、NERD、BE组中的检出率分别为50%、14.6%、25.7%, RE组中明显升高( $P = 0.003$ )。

## 3 讨论

GERD的发病率近年来有增高趋势, 这可能与诊断水平的提高、人们饮食及生活方式的改变等多种因素有关。GERD的发病主要是由于食管防御功能的减弱及攻击因素的增强。LESP降低等LES功能障碍及IEM增多等食管体部运动功能异常是食管防御功能减弱的主要表现, 与GERD的发病密切相关<sup>[7-8]</sup>。攻击因素包括反流入食管内的胃酸及胆汁等对食管黏膜的急慢性损伤等<sup>[9]</sup>。不同类型GERD患者临床症状相似, 但食管黏膜损伤及对抑酸等治疗的效果不同, 可能是由于其发病机制不完全相同所致。

三种不同类型的GERD患者中, 以RE患者的食管黏膜急性损伤最为显著。在我们的研究中发现, 50%的RE患者LESP低于正常范围, RE

### ■创新盘点

以往相关研究多是关于反流性食管炎与非糜烂性反流病二者发病机制的比较, 三种不同类型胃食管反流病发病机制的综合比较尚未见报道。本研究在统一的研究材料及方法下比较三者的差异, 突出了结果的可比性和可信性。



#### ■应用要点

由于不同类型胃食管反流病的发病机制存在差异,临床中治疗中应因人而异,根据患者的不同分型,选择相应合适的治疗方案。

患者的LESP及LESL的平均值较其他的GERD患者降低,且RE患者合并HH常见,HH可以影响胃食管连接部的结构,还可以诱发一过性下食管括约肌松弛的发生<sup>[10]</sup>;这些因素均加重了RE患者的LES屏障功能障碍。RE患者食管体部收缩波形态显著异常,近段食管以收缩脱落或缺失表现为主,远段食管有2/3的收缩为无效食管运动,其中以低幅蠕动表现明显;食管各段的收缩波波幅均明显减低,说明RE患者的食管体部运动功能障碍突出,特别是远段食管的酸清除能力明显减弱。因此RE患者的食管防御功能明显减弱。LES功能障碍致RE患者的胃食管反流发生的机会较多,而其食管酸清除功能减弱,使得反流入食管的胃酸等不能及时有效的清除。这些与食管内24 h pH监测所提示结果一致。RE患者酸暴露的持续时间较长,反流总时间延长,酸暴露多为重度,明显重于NERD与BE患者。因此,RE患者LES及食管体部运动功能受损严重,酸暴露明显,其食管黏膜受到反流物的侵蚀较重,食管黏膜损伤较重。

NERD患者的LES功能也有一定受损,但食管体部有效蠕动的比例在三者中最高。虽然NERD患者也有频发的酸反流,但由于其食管清除能力较强,酸暴露持续时间的指标阳性率并不高,即酸反流的持续时间较短,酸暴露以轻度为主。因此NERD患者内镜下食管黏膜损伤不明显。但NERD患者仍有明显的反流症状,考虑酸反流及其所致的黏膜损伤不是其临床症状的主要因素<sup>[11]</sup>。以往研究发现NERD患者的发病还与多种因素相关,部分NERD患者的临床症状是由胆汁或是气体等混合性反流引起;还有少数患者并不能监测到明显的反流,其症状与食管的高敏感性等因素有关<sup>[12]</sup>;应激抑郁等社会心理因素也是NERD患者的发病的重要因素<sup>[13]</sup>。

BE患者的食管黏膜以慢性损伤为主,急性炎症并不明显。在本研究发现,BE患者的LES及食管体部运动功能均有一定的异常,但受损程度明显轻于RE患者,说明BE患者食管内酸暴露发生的机会较RE患者少,食管酸清除能力较RE患者强,食管酸暴露以中度为主,食管黏膜急性损伤较RE患者轻。但BE患者食管远端的蠕动功能较差,食管下段的酸清除功能下降,进入食管的反流物不能被有效清除,长期持续的弱酸等反流物侵蚀,引起食管黏膜柱状上皮化生以适应食管下段的弱酸环境是BE患者食管黏膜病变的主要原因。以往也有研究发现BE黏膜为长期

慢性轻度的酸反流及胆汁反流对黏膜的浸泡侵蚀所致<sup>[9,14]</sup>,与本研究一致,这可能是BE患者对单纯抑酸剂的治疗反应并不十分理想,而且多数需要维持治疗的重要原因之一。

在临床治疗中可以发现,不同类型GERD患者对抑酸等治疗的反应不同,这与其发病机制的不同是治疗效果各异的基础。RE患者酸反流明显,食管黏膜的急性损伤与酸反流关系密切,因此强力抑酸剂效果较好<sup>[15]</sup>;而NERD患者的酸反流较轻,但患者反流症状较明显,部分患者对抑酸治疗反应不佳,经常需要配合抗焦虑等药物的共同作用<sup>[16]</sup>;而BE患者的发病则主要是由于食管运动功能障碍引起的长期弱酸反流的侵蚀,对食管运动功能的改善是治疗的基本途径,但目前尚缺乏改善食管运动功能的药物,因此多需要长期维持抑酸治疗。

三种不同类型GERD患者的LES和食管体部运动功能受损程度及酸暴露情况的差异,可能是其内镜下黏膜损伤表现不同及治疗效果各异的基础,临床中可以根据GERD的不同分型,选择相应合适的治疗方式。

#### 4 参考文献

- 1 Fass R, Ofman JJ. Gastroesophageal reflux disease--should we adopt a new conceptual framework? *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1901-1909
- 2 林三仁, 许国铭, 胡品津, 周丽雅, 陈旻湖, 柯美云, 袁耀宗, 房殿春, 萧树东. 中国胃食管反流病共识意见. *胃肠病学* 2007; 12: 233-239
- 3 张泰昌. 食管裂孔疝的内镜诊断. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 293-296
- 4 Nguyen NQ, Tippet M, Smout AJ, Holloway RH. Relationship between pressure wave amplitude and esophageal bolus clearance assessed by combined manometry and multichannel intraluminal impedance measurement. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2476-2484
- 5 Leite LP, Johnston BT, Barrett J, Castell JA, Castell DO. Ineffective esophageal motility (IEM): the primary finding in patients with nonspecific esophageal motility disorder. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1859-1865
- 6 DeMeester TR, Wang CI, Wernly JA, Pellegrini CA, Little AG, Klementsich P, Bermudez G, Johnson LF, Skinner DB. Technique, indications, and clinical use of 24 hour esophageal pH monitoring. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1980; 79: 656-670
- 7 Ho SC, Chang CS, Wu CY, Chen GH. Ineffective esophageal motility is a primary motility disorder in gastroesophageal reflux disease. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 652-656
- 8 查慧, 谢小平, 侯晓华. 胃食管反流病患者酸反流与食管运动功能障碍的关系. *胃肠病学* 2006; 11: 41-44
- 9 Caldwell MT, Lawlor P, Byrne PJ, Walsh TN, Hennessy TP. Ambulatory oesophageal bile reflux monitoring in Barrett's oesophagus. *Br J Surg* 1995;

- 82: 657-660
- 10 Kahrilas PJ, Shi G, Manka M, Joehl RJ. Increased frequency of transient lower esophageal sphincter relaxation induced by gastric distention in reflux patients with hiatal hernia. *Gastroenterology* 2000; 118: 688-695
  - 11 梁学亚, 蓝宇, 贾绮宾, 李笠, 范斌, 王启, 陈海翎. 反流性食管炎和非糜烂性反流病患者酸暴露与食管压力监测结果分析. *中华消化内镜杂志* 2006; 23: 11-14
  - 12 Martinez SD, Malagon IB, Garewal HS, Cui H, Fass R. Non-erosive reflux disease (NERD)--acid reflux and symptom patterns. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 537-545
  - 13 万小平, 张建忠, 王雁, 袁申元, 丁燕, 陈波, 王凝, 谢新纪. 反流性食管炎患者食管测压及pH监测值. *基础医学与临床* 2000; 20: 72-73
  - 14 Nehra D, Howell P, Williams CP, Pye JK, Beynon J. Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity. *Gut* 1999; 44: 598-602
  - 15 Pace F, Tonini M, Pallotta S, Molteni P, Porro GB. Systematic review: maintenance treatment of gastro-oesophageal reflux disease with proton pump inhibitors taken 'on-demand'. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 195-204
  - 16 石丽楠, 李长城. 帕罗西汀辅助治疗伴有抑郁或焦虑的非糜烂性胃食管反流病46例疗效观察. *医学信息* 2007; 20: 1419-1420

#### ■同行评价

本文选题较好, 结果可信, 具有很好的临床参考价值.

编辑 史景红 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

### 世界华人消化杂志外文字符标准

**本刊讯** 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub><sup>1</sup>, V<sub>max</sub>不能写成Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, *et Arn.var.glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylethanilide(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*<sub>max</sub>, *C*<sub>max</sub>, *V*<sub>d</sub>, *T*<sub>1/2</sub> *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2009-03-18)

## 骨形态发生蛋白2、6在肝癌中的表达及意义

吴建兵, 傅华群, 黄龙璋, 刘安文, 张吉翔

### ■背景资料

骨形态发生蛋白(BMPs)是一组能广泛参与调节多种细胞增殖、分化和凋亡的生物学过程的功能蛋白,能诱导前体细胞的迁移和分化。近期研究认为BMPs的表达不但涉及到胚胎、器官的形成,更包括肿瘤疾病的形成和发展,尤其在肿瘤的侵袭、转移特性中,BMPs扮演了十分重要的角色,可以显著增加细胞的迁移和侵袭性。

吴建兵, 黄龙璋, 刘安文, 南昌大学第二附属医院肿瘤科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006  
傅华群, 南昌大学第二附属医院肝胆外科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006  
张吉翔, 南昌大学第二附属医院消化内科 江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006  
作者贡献分布: 吴建兵与黄龙璋对此文所作贡献均等, 此课题由吴建兵, 傅华群, 张吉翔及黄龙璋设计; 研究过程由吴建兵, 黄龙璋及刘安文操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由吴建兵提供; 数据分析由黄龙璋完成; 此论文写作由吴建兵与黄龙璋完成。  
通讯作者: 吴建兵, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院肿瘤科, 江西省分子医学重点实验室。  
wujb555@hotmail.com  
电话: 0791-6292596 传真: 0791-6292596  
收稿日期: 2009-02-02 修回日期: 2009-02-12  
接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-18

### Expression of bone morphogenetic protein 2 and 6 and clinical significance in liver carcinoma

Jian-Bing Wu, Hua-Qun Fu, Long-Zhang Huang, An-Wen Liu, Ji-Xiang Zhang

Jian-Bing Wu, Long-Zhang Huang, An-Wen Liu, Department of Oncology, the Second Hospital Affiliated to Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Hua-Qun Fu, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Hospital Affiliated to Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China  
Correspondence to: Jian-Bing Wu, Department of Oncology, the Second Hospital Affiliated to Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, 1 Middle Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. wujb555@hotmail.com  
Received: 2009-02-02 Revised: 2009-02-12  
Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-18

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of bone morphogenetic protein 2 and 6 (BMP-2, 6) mRNA in human liver cancer, and to explore its relationship with biologic action in liver cancer.

**METHODS:** The expressions of BMP-2 and BMP-6 in 30 carcinoma liver tissue samples and 30 normal

liver tissue samples were detected and analyzed by reverse transcriptase PCR and Western blot.

**RESULTS:** The relative level of BMP-2 and BMP-6 mRNA was significantly lower in the normal liver tissue samples than in the liver carcinoma tissue samples ( $0.3245 \pm 0.1127$  vs  $0.8298 \pm 0.1187$ ,  $0.2947 \pm 0.1853$  vs  $0.7145 \pm 0.1373$ , both  $P < 0.05$ ). The relative level of BMP-2 and BMP-6 mRNA in III, IV stages of liver cancer was significantly higher than that in I, II stages ( $0.92431 \pm 0.1234$  vs  $0.69355 \pm 0.1925$ ,  $0.8354 \pm 0.1423$  vs  $0.6043 \pm 0.1234$ , both  $P < 0.05$ ). The expression level of BMP-2 and BMP-6 protein were significantly higher in the metastatic liver cancer compared with that without metastasis ( $0.9854 \pm 0.2888$  vs  $0.6244 \pm 0.3087$ ,  $0.9076 \pm 0.1276$  vs  $0.5678 \pm 0.2493$ , both  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Up-regulated expressions of BMP-2 and BMP-6 play an important role in liver cancer. It may have the active role in invasion and metastasis of liver cancer.

**Key Words:** Carcinoma; Hepatocellula; Bone morphogenetic proteins; Reverse transcriptase PCR; Western blot

Wu JB, Fu HQ, Huang LZ, Liu AW, Zhang JX. Expression of bone morphogenetic protein 2 and 6 and clinical significance in liver carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 834-837

### 摘要

**目的:** 研究骨形态发生蛋白2、6(BMP-2、6)在肝癌组织中的表达,并探讨其与肝癌生物学行为的关系。

**方法:** 应用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和Western blot检测30例正常肝脏组织和30例肝癌组织的BMP-2、6的表达水平。

**结果:** 正常肝脏组织BMP-2、6 mRNA相对表达量显著低于肝癌组织( $0.3245 \pm 0.1127$  vs  $0.8298 \pm 0.1187$ ,  $0.2947 \pm 0.1853$  vs  $0.7145 \pm 0.1373$ , 均 $P < 0.05$ )。Ⅲ、Ⅳ期肝癌组织BMP-2、6 mRNA相对表达量显著高于Ⅰ、

### ■同行评议者

党双锁, 教授, 西安交通大学第二医院感染科

II期( $0.92431 \pm 0.1234$  vs  $0.69355 \pm 0.1925$ ,  $0.8354 \pm 0.1423$  vs  $0.6043 \pm 0.1234$ , 均 $P < 0.05$ ). Western blot检测有远处转移的肝癌组织BMP-2、6表达高于无远处转移的肝癌组织( $0.9854 \pm 0.2888$  vs  $0.6244 \pm 0.3087$ ,  $0.9076 \pm 0.1276$  vs  $0.5678 \pm 0.2493$ , 均 $P < 0.01$ ).

**结论:** BMP-2、6在肝癌中表达上调, 可能在肝癌的发生发展中起着重要的作用, 其表达上调可能促进肝癌的浸润和转移.

**关键词:** 癌; 肝细胞; 骨形态发生蛋白; 逆转录-聚合酶链反应; 蛋白质印迹

吴建兵, 傅华群, 黄龙璋, 刘安文, 张吉翔. 骨形态发生蛋白2、6在肝癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 834-837 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/834.asp>

## 0 引言

肝癌具有的高度侵袭和转移能力是影响肝癌治疗和预后的关键因素. 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是一组能广泛参与调节多种细胞增殖、分化和凋亡的生物学过程的功能蛋白, 能诱导前体细胞的迁移和分化. 近期研究认为BMPs的表达不但涉及到胚胎、器官的形成, 更包括肿瘤疾病的形成和发展, 尤其在肿瘤的侵袭、转移特性中, BMPs扮演了十分重要的角色, 可以显著增加细胞的迁移和侵袭性. 因此, 本研究旨在探讨与肿瘤发生密切相关的BMP-2、6在人肝癌组织中的表达及其与临床分期、病理的关系, 为进一步深入研究BMPs在人肝癌发生、发展及生物学特性中所起的作用提供理论和实验依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2007-09/2008-09收集的新鲜肝癌组织标本30例, 其中手术切除的新鲜肝癌标本24例, 穿刺活检标本6例(有远处转移, 不适合手术切除的肝癌). 另取正常新鲜肝脏组织标本30例作为对照. 30例肝癌患者年龄38-73(平均61)岁. 依照国际抗癌联盟组织(UICC)颁发的恶性肿瘤TNM分期标准<sup>[1]</sup>, 根据术前影像学检查CT、MRI和全身骨扫描结果、手术中肿瘤形态和浸润情况、肝门淋巴结是否转移以及门静脉主干有无癌栓形成等病理情况进行TNM分期, 其中I期4例、II期8例、III期12例、IV期6例; 肝门淋巴结转移2例; 门静脉主干及分支癌栓4例; 远处转移6例, 其中肺转移2例、骨转移4例. 按原发性肝癌病理大

体分型和组织病理分型方法, 其中巨块型23例, 结节型7例; 肝细胞癌21例、胆管细胞癌9例. 治疗前AFP阳性者23例, 阴性者7例. 胰蛋白酶(北京Solarbio公司), TRIzol试剂(北京天更公司), Lipofectamine 2000(Invitrogen公司), 逆转录试剂盒(Fermentas公司), BMP-2、6鼠抗人mAb、Actin兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz公司), 辣根酶标记山羊抗鼠IgG、辣根酶标记山羊抗兔IgG(北京中杉金桥生物公司), 免疫印迹配胶、电泳、电转装置(Bio-Rad公司).

### 1.2 方法

**1.2.1 RT-PCR检测BMP-2、6 mRNA的表达:** 使用TRIzol试剂按说明分别提取人肝癌组织总RNA. 逆转录反应按试剂盒操作说明进行. 引物由广州锐博生物工程有限公司合成. BMP-2引物上游5'-AACCTGCAACAGCCAACT-3'; 下游5'-GGAGCCACAATCCAGTCAT-3', PCR产物长度418 bp, BMP-6引物上游5'-TCAGCGACACCA CAAAGAGT-3'; 下游5'-CTGGGTAGAGCGATTACGACT-3', PCR产物长度478 bp. 内参GAPDH引物上游5'-GAAGGTCTGGAGTCAACGG-3', 下游5'-GCTCAGTGTAGCCCAGGAT-3', PCR产物长度为825 bp. PCR扩增条件: 94℃预变性2 min, 然后94℃变性45 s, 52℃退火45 s, 72℃延伸30 s, 共30个循环, 最后72℃延伸10 min. PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶电泳后观察结果.

**1.2.2 Western blot印迹检测:** 取各组标本等量加入500  $\mu$ L裂解液中(10 mmol/L Tris-HCl, pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 25 g/L SDS, 25 g/L TritonX-100, 1 mol/L EDTA, 抑酞酶2 mg/L), 冰上孵育裂解细胞20 min, 离心2 min后取上清液-20℃保存备用. 采用Bradford法测定蛋白质浓度, 以50  $\mu$ g/孔上样, 在非还原的条件下经120 g/L的SDS-PAGE凝胶进行电泳分离后, 转移至硝酸纤维素膜上, 在含50 g/L脱脂奶粉的PBS中4℃封闭过夜, 加入1:200稀释的鼠抗人BMP-2抗体, 室温下反应2 h, 经0.05% Tween-PBS洗涤3次后, 再与1:2000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG作用2 h, 0.05% Tween-PBS洗涤3次, 每次10 min. 最后, ECL显影, 压片, 观察结果. 测定目的条带的灰度值, 以 $\beta$ -actin为内参照, 目的蛋白量 = 目的蛋白条带吸光度/ $\beta$ -actin条带光密度, 实验重复3次.

**统计学处理** 用SPSS13.0软件进行统计学分析, 各组实验数据以mean $\pm$ SD表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 $t$ 检验,

### ■ 研发前沿

由于BMPs在大多数肿瘤中均有高表达而成为目前肿瘤研究领域的新热点.



## ■ 相关报道

Langenfeld *et al* 研究发现BMP-2在人类非小细胞肺癌中异常高表达,在肺良性肿瘤及正常肺组织中无表达,BMP-2在前列腺癌、大肠癌、黑色素瘤及骨髓瘤及头颈部肿瘤中均过表达。

表 1 BMP-2、6 基因在肝癌及正常肝组织中的半定量分析 (mean  $\pm$  SD,  $n = 30$ )

分组	BMP-2	BMP-6
正常肝脏组织	0.3245 $\pm$ 0.1127	0.2947 $\pm$ 0.1853
肝癌组织	0.8298 $\pm$ 0.1187 <sup>a</sup>	0.7145 $\pm$ 0.1373 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 正常肝脏组织。

$P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 半定量RT-PCR检测结果 BMP-2、6基因在正常肝脏组织中的表达水平明显低于肝癌组织,差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 表1, 图1)。

半定量RT-PCR显示, BMP-2 mRNA表达与病例的年龄、病理大体和组织学分型及甲胎蛋白无关( $P > 0.05$ ),但在不同的病理分期因素中,III、IV期表达指数为 $0.92431 \pm 0.1234$ ,显著高于I、II期( $0.69355 \pm 0.1925$ ),两者差异有显著统计学意义( $P < 0.05$ )。BMP-6 mRNA表达亦有相似的结果(表2)。

2.2 Western blot检测结果 Western blot检测显示肝癌组织BMP-2、6蛋白表达量明显高于正常肝组织,区域转移(肝门淋巴结、门静脉主干)肝癌及远处转移(肺、骨)肝癌组织BMP-2、6蛋白表达量与无转移肝癌相比有显著差异( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , 表3, 图2)。

## 3 讨论

BMPs是一组能诱导异位软骨和骨形成的具有类似结构的功能蛋白,人们发现其广泛分布于人体多种组织和细胞,参与调节多种细胞的增殖、分化和凋亡的生物学过程,对他的研究一直是干细胞、细胞分化、细胞凋亡、肿瘤发病机制等研究课题的重要内容。由于BMPs在大多数肿瘤中均有高表达而成为目前肿瘤研究领域的新热点。BMPs在多种肿瘤中均有表达异常,以过表达为主,其中尤以BMP-2、3、4、5、6、7的表达更为常见且重要,BMP-2在98%的非小细胞肺癌中过表达<sup>[2]</sup>,Langenfeld *et al*<sup>[3]</sup>研究发现BMP-2在人类非小细胞肺癌中异常高表达,在肺良性肿瘤及正常肺组织中无表达,BMP-2在前列腺癌、大肠癌、黑色素瘤及骨髓瘤及头颈部肿瘤中均过表达<sup>[4-7]</sup>;BMP-6在骨肉瘤、结肠癌、前列腺癌、乳腺癌细胞中高表达<sup>[8-10]</sup>,但BMP-2、6在肝癌的表达及其与肝癌的发生发展

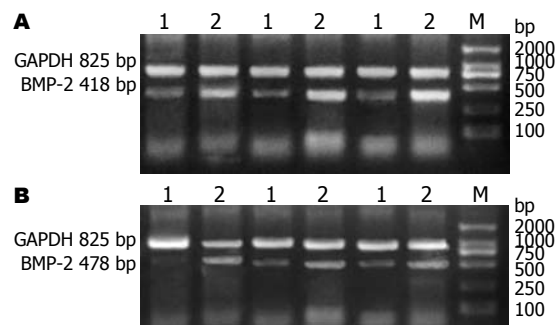


图 1 肝癌及正常组织中的BMP-2及BMP-6基因的表达。A: BMP-2; B: BMP-6; 1: 正常肝组织; 2: 肝癌组织; M: DNA marker。

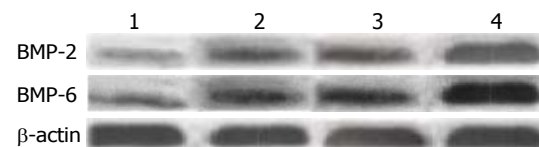


图 2 BMP-2、6蛋白表达与肝癌病理学因素间的关系。1-4: 对应正常肝组织、无转移、区域转移、远处转移肝癌BMP-2、6蛋白表达结果; 最下条带为相应标本的 $\beta$ -actin内参照。

和病理的关系未见报道。

细胞迁移是器官形成和肿瘤发生的生物学基础。在肿瘤的侵袭、转移中, BMPs扮演了十分重要的角色, 众多的研究一致显示BMPs可以显著增加细胞的迁移和侵袭性。Busch *et al*<sup>[11]</sup>发现BMP-2可以增加黑色素瘤B16-F1细胞的侵袭性。Darby *et al*<sup>[12]</sup>报道BMP-6对前列腺癌PC3M和DU145细胞的增殖无明显增强作用, 但显著增加了细胞的迁移和侵袭性, 同时也观察到BMP-6可以诱导金属蛋白酶MMP-1和MMP-9 mRNA以及MAPK(促分裂原活化蛋白激酶)磷酸化水平的升高。Feeley *et al*<sup>[13]</sup>报道BMP-2的天然拮抗剂noggin可以抑制BMP-2介导的前列腺癌侵袭生长。

本组资料结果显示, 肝癌BMP-2、6 mRNA相对表达显著高于正常肝脏组织, 提示在肝癌的发生发展中有一定的促进肿瘤生成的作用, 肝癌中BMP-2、6 mRNA的表达与年龄、肿瘤的病理分型无关, 而与肿瘤的分期明显相关。蛋白印迹检测显示随着肝癌转移程度的增加, BMP-2、6蛋白表达明显上调, 提示BMP-2、6作为肿瘤转移促进基因在肝癌的浸润和转移中起着重要的作用, 这与BMP-2、6在其他肿瘤浸润和转移中的表现一致。肝癌的发生发展是一个多基因、多因子作用的过程, BMP-2、6可能参与肝癌的发生和发展, 与区域转移和远处转移可能更有密切关系, 继续深入研究将可能对肝

表 2 BMP-2、6 mRNA表达与肝癌病理学因素间的关系 (mean ± SD)

病理学因素	n	BMP-2	P值	BMP-6	P值
年龄					
>60岁	13	0.8222 ± 0.2002		0.7221 ± 0.1343	
<60岁	17	0.8401 ± 0.1193	>0.05	0.6888 ± 0.2034	>0.05
病理分期					
I、II期	12	0.69355 ± 0.1925		0.6043 ± 0.1234	
III、IV期	18	0.92431 ± 0.1234	<0.05	0.8354 ± 0.1423	<0.05
大体病理分型					
巨块型	23	0.8187 ± 0.1593		0.7281 ± 0.1009	
结节型	7	0.8443 ± 0.1003	>0.05	0.7081 ± 0.1876	>0.05
组织病理分型					
肝细胞癌	21	0.8111 ± 0.1387		0.7312 ± 0.1299	
胆管细胞癌	9	0.8333 ± 0.2093	>0.05	0.7009 ± 0.1987	>0.05
AFP					
阴性	7	0.8265 ± 0.1139		0.6998 ± 0.1658	
阳性	23	0.8351 ± 0.1983	>0.05	0.7265 ± 0.1876	>0.05

## ■同行评价

本文选题尚可, 具有一定的临床指导意义。

表 3 BMP-2、6蛋白表达与肝癌病理学因素间的关系 (mean ± SD)

分组		BMP-2	BMP-6
正常肝组织	30	0.3452 ± 0.2123	0.2354 ± 0.1393
无转移肝癌	18	0.6244 ± 0.3087	0.5678 ± 0.2493
区域转移肝癌	6	0.8044 ± 0.2855 <sup>a</sup>	0.7898 ± 0.2556 <sup>a</sup>
远处转移肝癌	6	0.9854 ± 0.2888 <sup>b</sup>	0.9076 ± 0.1276 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 无转移肝癌。

癌的早期诊断和评估浸润和转移风险有一定的临床指导意义。

## 4 参考文献

- Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997; 80: 1803-1804
- Langenfeld EM, Bojnowski J, Perone J, Langenfeld J. Expression of bone morphogenetic proteins in human lung carcinomas. *Ann Thorac Surg* 2005; 80: 1028-1032
- Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J. The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1445-1454
- Rothhammer T, Poser I, Soncin F, Bataille F, Moser M, Bosserhoff AK. Bone morphogenetic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res* 2005; 65: 448-456
- Beck SE, Jung BH, Fiorino A, Gomez J, Rosario ED, Cabrera BL, Huang SC, Chow JY, Carethers JM. Bone morphogenetic protein signaling and growth suppression in colon cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G135-G145
- Yang S, Pham LK, Liao CP, Frenkel B, Reddi AH, Roy-Burman P. A novel bone morphogenetic protein signaling in heterotypic cell interactions in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 198-205
- Sotobori T, Ueda T, Myoui A, Yoshioka K, Nakasaki M, Yoshikawa H, Itoh K. Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3927-3938
- Bobinac D, Marić I, Zorčić S, Spanjol J, Dordević G, Mustać E, Fuckar Z. Expression of bone morphogenetic proteins in human metastatic prostate and breast cancer. *Croat Med J* 2005; 46: 389-396
- Dai J, Keller J, Zhang J, Lu Y, Yao Z, Keller ET. Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism. *Cancer Res* 2005; 65: 8274-8785
- Lee J, Son MJ, Woolard K, Donin NM, Li A, Cheng CH, Kotliarova S, Kotliarov Y, Walling J, Ahn S, Kim M, Totonchy M, Cusack T, Ene C, Ma H, Su Q, Zenklusen JC, Zhang W, Maric D, Fine HA. Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell* 2008; 13: 69-80
- Busch C, Drews U, Eisele SR, Garbe C, Oppitz M. Noggin blocks invasive growth of murine B16-F1 melanoma cells in the optic cup of the chick embryo. *Int J Cancer* 2008; 122: 526-533
- Darby S, Cross SS, Brown NJ, Hamdy FC, Robson CN. BMP-6 over-expression in prostate cancer is associated with increased Id-1 protein and a more invasive phenotype. *J Pathol* 2008; 214: 394-404
- Feeley BT, Krenek L, Liu N, Hsu WK, Gamradt SC, Schwarz EM, Huard J, Lieberman JR. Overexpression of noggin inhibits BMP-mediated growth of osteolytic prostate cancer lesions. *Bone* 2006; 38: 154-166

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

## 肝内胆管细胞性肝癌临床特点分析90例

吴亚夫, 施晓雷, 徐庆祥, 丁义涛

### ■背景资料

肝内胆管细胞癌 (ICC) 系由肝内胆管上皮发生的1种原发性肝癌, 约占原发性肝癌的5%-15%, 根治性切除是最佳的治疗手段。由于ICC比较少见, 在临床诊治过程中, 容易发生误诊漏诊。

吴亚夫, 施晓雷, 徐庆祥, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

作者贡献分布: 此课题由吴亚夫、施晓雷、徐庆祥及丁义涛设计; 研究过程由吴亚夫、施晓雷及徐庆祥操作完成; 数据分析由施晓雷与徐庆祥完成; 本论文写作由吴亚夫与施晓雷完成。

通讯作者: 丁义涛, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科。yitaoding@hotmail.com

电话: 025-83304616 传真: 025-83317016

收稿日期: 2008-12-21 修回日期: 2009-01-16

接受日期: 2009-01-19 在线出版日期: 2009-03-18

### Clinical features of intrahepatic cholangiocarcinoma: an analysis of 90 cases

Ya-Fu Wu, Xiao-Lei Shi, Qing-Xiang Xu, Yi-Tao Ding

Ya-Fu Wu, Xiao-Lei Shi, Qing-Xiang Xu, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, Drum Tower Affiliated Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, Drum Tower Affiliated Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yitaoding@hotmail.com

Received: 2008-12-21 Revised: 2009-01-16

Accepted: 2009-01-19 Published online: 2009-03-18

### Abstract

**AIM:** To explore clinical features of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and to guide clinical practice.

**METHODS:** Clinical data of 90 cases with ICC undergoing surgery during 1985-01 and 2003-01 were retrospectively studied.

**RESULTS:** Sixty two patients had chief complaint of abdominal pain. Thirty two patients had HBV infection history, and 42 patients experienced cirrhosis. Before operation, AFP was positive in 29 cases and CA199 was positive in 56 cases, and  $\gamma$ -GT was significantly increased in 61 cases. Thirty one patients and 58 patients had characteristic B-mode manifestation and CT manifestations. Statistic analysis demonstrated that 1-, 3-, 5-year survival rates for patients who underwent radical operation were significantly different those who underwent palliative operation (81.1% vs 16.7%, 43.6% vs 0.0%, 43.6% vs

0.0%, all  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** ICC has non-specific clinical manifestations. CA199 and  $\gamma$ -GT are useful in the diagnosis of ICC. B-mode ultrasonography and CT are important for diagnosis of ICC. The radical surgical resection is the only method to ensure a long-term survival.

**Key Words:** Intrahepatic cholangiocarcinoma; Diagnosis; Treatment; Surgery

Wu YF, Shi XL, Xu QX, Ding YT. Clinical features of intrahepatic cholangiocarcinoma: an analysis of 90 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 838-840

### 摘要

**目的:** 分析肝内胆管细胞性肝癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)的临床特点, 以期对临床诊治进行指导。

**方法:** 回顾分析我科1985-01/2003-01行手术探查的90例ICC患者临床资料。

**结果:** 64例患者有右上腹隐痛不适等非特异性症状表现; 32例有乙肝病史; 42例(46.7%)合并肝硬化。29例术前检查AFP为阳性; 56例术前检查CA199为阳性; 61例术前检查 $\gamma$ -GT增高。31例术前B超检查发现肝内占位合并肝门淋巴结肿大; 58例术前CT检查提示肿瘤有典型的低血供表现。90例ICC患者中, 38例行手术根治性切除, 其1、3、5年生存率分别为81.1%、43.6%、43.6%。余52例行姑息性手术切除, 其1、3、5年生存率分别为16.7%、0.0%、0.0%。

**结论:** ICC临床表现多样, 无明显特点。CA199阳性及 $\gamma$ -GT增高提示ICC可能。ICC易发生肝门淋巴结转移。B超和CT联合能发现病灶及明确病灶性质。ICC以手术治疗为主, 根治性手术切除是保证长期生存的唯一途径。

**关键词:** 肝内胆管细胞性肝癌; 诊断; 治疗; 手术

吴亚夫, 施晓雷, 徐庆祥, 丁义涛. 肝内胆管细胞性肝癌临床特点

### ■同行评议者

龚建平, 教授, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

分析90例. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 838-840  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/838.asp>

## 0 引言

原发性肝癌按病理分为肝细胞性肝癌和肝内胆管细胞性肝癌. 其中, 肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)系由肝内胆管上皮发生的1种原发性肝癌, 约占原发性肝癌的5%-15%<sup>[1]</sup>, 根治性切除是最佳的治疗手段<sup>[2]</sup>. 由于ICC比较少见, 在临床诊治过程中, 容易发生误诊漏诊. 因此有必要对ICC患者的临床资料加以分析、总结, 以指导临床诊治、提高根治性手术切除率. 本文回顾分析我科1985-01/2003-01行手术探查的ICC患者90例临床资料, 现报告如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 1985-01/2003-01我科行手术探查的ICC患者90例, 男62例, 女28例, 中位年龄54(39-75)岁.

1.2 方法 整理归纳相关临床资料, 对以下因素进行分析: 年龄、性别、首发临床症状(腹痛)、乙肝病史、是否合并肝硬化、r-GT、肿瘤标志物(AFP、CA199)、术前B超和CT检查特点、手术根治性切除率及其术后生存率、姑息性切除率及其术后生存率.

**统计学处理** 应用SPSS15.0软件进行统计学分析.

## 2 结果

64例(71.1%)有右上腹隐痛不适等非特异性症状表现; 32例(35.6%)有乙肝病史; 42例(46.7%)合并肝硬化. 29例(32.2%)术前检查AFP为阳性; 56例(62.2%)术前检查CA199为阳性; 61例(67.8%)术前检查r-GT增高. 31例(34.4%)术前B超检查发现肝内占位合并肝门淋巴结肿大; 58例(64.4%)术前CT检查提示肿瘤有典型的低血供表现. 38例(42.2%)行手术根治性切除, 其中1, 3, 5年生存率分别为81.1%, 43.6%, 43.6%. 行姑息性手术切除的, 为52例(57.8%), 其1, 3, 5年生存率分别为16.7%, 0%, 0%. 与根治性切除相比有极显著差异.

## 3 讨论

ICC是一种特殊病理组织学类型的原发性肝癌, 其恶性程度高, 瘤体数目以多个常见, 瘤体包膜常不完整, 淋巴结转移率高. 广泛的肝原发灶切除加区域淋巴结清扫作为ICC的标准术式. 这

主要是因为ICC早期易发生肝内播散并侵犯周围组织, 其淋巴结转移率高<sup>[3]</sup>. Tsuji *et al*<sup>[4]</sup>报道: ICC的淋巴结转移主要是经由肝十二指肠韧带组淋巴结, 然后至肝总动脉淋巴结和主动脉旁淋巴结. 癌组织位于肝左外叶者, 淋巴扩散还可经胃小弯至胃左动脉淋巴结. 因此, 手术清扫肝十二指肠韧带及周围组织淋巴结对提高治疗效果具有重要意义. 但由于ICC在术前较难明确诊断, 易导致术中未实施系统的淋巴结清扫, 从而直接影响患者的预后. 因此, 提高术前ICC的诊断水平尤为重要. 最近有学者采用术前穿刺<sup>[5]</sup>、FDG PET<sup>[6]</sup>检查以及MnDPDP MR增强扫描<sup>[7]</sup>等方法, 对ICC的术前诊断新方法进行了有益的尝试. 然而由于费用昂贵, 这些方法目前仍处于小规模实验阶段, 尚无法在临床上大规模采用. 基于以上原因, 本研究对ICC与HICC在常规检查手段方面的结果进行了比较分析, 从而总结出符合临床实际的、合理可行的诊疗方法.

ICC的症状多样. 常见症状如腹痛、乏力、纳差、消瘦. 其中以腹痛最常见, 但没有特异性. 由于肝细胞性肝癌常有病毒性肝炎背景(80%-90%), 多伴有肝硬化(54%-85%)<sup>[8]</sup>. 于本组资料比, ICC该两项病史特点有明显区别, 并且ICC患者常合并有肝内外胆管结石病史或胆道手术史, 这些都有助于ICC术前的诊断.

在术前常规实验室检查中, 我们统计ICC患者甲胎蛋白阳性29例占32.2%, CA19-9阳性56例占62.2%, r-GT升高者61例(67.8%). 以上指标较有代表性. 但其阳性率均不高, 故只能供术前诊断时参考.

由于临床表现缺乏特征性、实验室检查阳性率不高, 影像学检查仍然是目前术前诊断ICC的重要方法. ICC在CT上常表现为低密度、等密度或混杂密度肿块. 瘤体所在肝实质胆管扩张, 肝叶萎缩, 邻近包膜回缩. 并常可合并肝胆管结石. 而其典型增强扫描表现为: 增强扫描动脉期和门脉期均无明显强化, 但延迟扫描见肿瘤强化, 较邻近肝密度高. 这种早期强化轻而延时强化明显的“慢进慢出”现象<sup>[9]</sup>, 与HICC的典型“快进快出”现象有明显区别. 其原因为: ICC多为乏血供肿瘤, 且含有丰富的纤维组织, 而纤维组织是产生肿瘤延迟强化的病理基础. 碘造影剂从血管渗透到纤维组织速度慢, 同时其清除速度也慢, 延时增强常表现为斑片状、条状及分隔状强化; 而HCC多为富血供肿瘤, 碘造影剂从进入到清除都较快<sup>[10]</sup>. 此外, ICC易发生腹

### ■研发前沿

FDG PET检查以及MnDPDP MR增强扫描等方法作为新兴的检查手段, 能提高ICC的术前诊断, 然而费用昂贵, 无法在临床上大规模采用.

### ■相关报道

FDG PET检查以及MnDPDP MR增强扫描等方法作为新兴的检查手段, 能提高ICC的术前诊断, 然而费用昂贵, 无法在临床上大规模采用.



## ■应用要点

CA199阳性及r-GT增高提示ICC的可能, B超和CT联合能有助于发现病灶及分辨病灶性质, 根治性手术切除是保证ICC术后长期生存的唯一途径。

腔淋巴结肿大转移, 而不易引起门脉癌栓, 这些都是较特征性的间接表现, 对于ICC的诊断具有重要的参考价值。ICC在常规B超常表现为肝占位且合并肝门淋巴结肿大。特殊B超检查方法中, von Herbay *et al*<sup>[11]</sup>报道ICC肿块在超声造影动脉相呈现周边厚环状、内部稀疏羽毛状高增强, 而延迟相为低回声, 没有CT上延迟强化的现象。所以我们认为术前将B超和CT的特征性表现相结合将有助于术前ICC的诊断。

ICC恶性程度高, 而且对化疗和放疗都不敏感, 预后差。至今为止, 手术仍被认为是治疗ICC最有效的方法, 根治性切除能明显增加ICC患者术后生存率<sup>[12]</sup>。但是由于目前ICC早期确诊率低, 其根治性切除率很低。本组数据显示: ICC根治手术切除率仅为42.2%。其中手术根治性切除的患者, 术后1、3、5年生存率要明显高于非根治性切除的患者, 提示根治性手术切除是达到长期生存的唯一途径。相似地, Puhalla *et al*<sup>[13]</sup>认为有无淋巴结转移、是否达到R<sub>0</sub>切除, 切缘是否大于3 mm, 以及肿块类型是独立的预后因素。Stain *et al*<sup>[14]</sup>及Lang *et al*<sup>[15]</sup>的研究均显示根治性切除与否直接影响长期生存率以及中位生存时间; Stain *et al*<sup>[14]</sup>还提出未能达到R<sub>0</sub>切除的患者术后若辅以放疗将显著提高患者术后5年生存率, 为ICC围手术期综合治疗提出了值得探索的有益方案。

总之, ICC无特异的临床表现, CA199阳性及r-GT增高提示有ICC的可能。B超和CT联合能有助于发现病灶及分辨病灶性质。ICC以手术治疗为主, 根治性手术切除是保证长期生存的唯一途径。

## 4 参考文献

- 1 McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, Devesa SS, Fraumeni JF Jr. International trends and patterns of primary liver cancer. *Int J Cancer* 2001; 94: 290-296
- 2 Huang JL, Biehl TR, Lee FT, Zimmer PW, Ryan JA Jr. Outcomes after resection of cholangiocellular carcinoma. *Am J Surg* 2004; 187: 612-617
- 3 Goodman ZD. Neoplasms of the liver. *Mod Pathol* 2007; 20 Suppl 1: S49-S60
- 4 Tsuji T, Hiraoka T, Kanemitsu K, Takamori H,

Tanabe D, Tashiro S. Lymphatic spreading pattern of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surgery* 2001; 129: 401-407

- 5 Pupulim LF, Felce-Dachez M, Paradis V, Vullierme MP, Zappa M, Bedossa P, Vilgrain V. Algorithm for immediate cytologic diagnosis of hepatic tumors. *AJR Am J Roentgenol* 2008; 190: W208-W212
- 6 Paudyal B, Oriuchi N, Paudyal P, Tsushima Y, Higuchi T, Miyakubo M, Ishikita T, Nakajima T, Endo K. Clinicopathological presentation of varying 18F-FDG uptake and expression of glucose transporter 1 and hexokinase II in cases of hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma. *Ann Nucl Med* 2008; 22: 83-86
- 7 Karabacakoglu A, Adigüzel Y, Karaköse S, Kayaçetin E, Haykir R. Characterization of focal liver lesions: use of mangafodipir trisodium (MnDPDP)-enhanced MR images. *Turk J Gastroenterol* 2006; 17: 164-171
- 8 吴阶平, 裘法祖. 黄家驹外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1223-1224
- 9 Miller G, Schwartz LH, D'Angelica M. The use of imaging in the diagnosis and staging of hepatobiliary malignancies. *Surg Oncol Clin N Am* 2007; 16: 343-368
- 10 Lee JW, Han JK, Kim TK, Kim YH, Choi BI, Han MC, Suh KS, Kim SW. CT features of intraductal intrahepatic cholangiocarcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 175: 721-725
- 11 von Herbay A, Vogt C, Willers R, Häussinger D. Real-time imaging with the sonographic contrast agent SonoVue: differentiation between benign and malignant hepatic lesions. *J Ultrasound Med* 2004; 23: 1557-1568
- 12 Uenishi T, Hirohashi K, Kubo S, Yamamoto T, Yamazaki O, Shuto T, Tanaka H, Kinoshita H. Clinicopathologic features in patients with long-term survival following resection for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1069-1072
- 13 Puhalla H, Schuell B, Pokorny H, Kornek GV, Scheithauer W, Gruenberger T. Treatment and outcome of intrahepatic cholangiocellular carcinoma. *Am J Surg* 2005; 189: 173-137
- 14 Stein DE, Heron DE, Rosato EL, Anné PR, Topham AK. Positive microscopic margins alter outcome in lymph node-negative cholangiocarcinoma when resection is combined with adjuvant radiotherapy. *Am J Clin Oncol* 2005; 28: 21-23
- 15 Lang H, Sotiropoulos GC, Frühauf NR, Dömland M, Paul A, Kind EM, Malagó M, Broelsch CE. Extended hepatectomy for intrahepatic cholangiocellular carcinoma (ICC): when is it worthwhile? Single center experience with 27 resections in 50 patients over a 5-year period. *Ann Surg* 2005; 241: 134-143

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

## ■同行评价

本研究设计合理, 结果可靠, 具有较好的临床参考价值。

## B7-H1在结肠癌组织中的表达及意义

刘书漫, 刘国红, 张钦宪, 刘占举

刘书漫, 刘国红, 张钦宪, 郑州大学基础医学院组织学与胚胎学教研室 河南省郑州市 450052

刘占举, 郑州大学第二附属医院消化内科免疫病理实验室 河南省郑州市 450014

教育部新世纪优秀人才支持计划基金资助项目, No. NECT-05-0609

河南省重大科技攻关基金资助项目, No. 0222031300

作者贡献分布: 此课题由刘书漫, 张钦宪及刘占举设计; 实验操作由刘书漫及刘国红完成; 研究所用新试剂及分析工具由刘占举提供; 本论文写作由刘书漫, 张钦宪及刘占举完成。

通讯作者: 张钦宪, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 郑州大学基础医学院组织胚胎教研室. qxz53@zzu.edu.cn

电话: 0371-67781953 传真: 0371-67781953

收稿日期: 2008-12-06 修回日期: 2009-01-23

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-18

### Expression of B7-H1 and its significance in colon cancer

Shu-Man Liu, Guo-Hong Liu, Qin-Xian Zhang, Zhang-Ju Liu

Shu-Man Liu, Guo-Hong Liu, Qin-Xian Zhang, Department of Histology and Embryology, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Zhang-Ju Liu, Laboratory of Immunopathology, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China

Supported by: the New Century Talent Supporting Scheme Projects of the Ministry of Education, No. NCET-05-0609; and the Key Scientific and Technological Projects in Henan Province, No. 0222031300

Correspondence to: Qin-Xian Zhang, Department of Histology and Embryology, School of Basic Medicine, Zhengzhou University, 40 Daxue Road, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. qxz53@zzu.edu.cn

Received: 2008-12-06 Revised: 2009-01-23

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-18

### Abstract

**AIM:** To study the relationship between expression of B7-H1 in colon cancer and neoplasm metastasis.

**METHODS:** Expressions of B7-H1 in 64 cases of colon cancer and in 18 cases of tumor adjacent normal colon mucous tissue were assayed by immunohistochemical staining, and its correlations with patients' clinical pathological indexes were analyzed.

**RESULTS:** B7-H1 protein expression was posi-

tive in colon cancer tissues, and the positive rate was 48.44%. But the positive rate of B7-H1 protein expression in tumor adjacent colon mucous tissue was 22.22%, and statistically significant difference was observed ( $P < 0.05$ ). The positive rate of B7-H1 protein in colon cancer tissue was correlated with lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ), but not with the invasion depth, cellular differentiation or pTNM stage.

**CONCLUSION:** B7-H1 may be used as a new biological indicator to predict metastatic potential of colon cancer.

**Key Words:** B7-H1; Colon cancer; Lymph node metastasis

Liu SM, Liu GH, Zhang QX, Liu ZJ. Expression of B7-H1 and its significance in colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 841-843

### 摘要

**目的:** 探讨结肠癌组织中B7-H1的表达及其与肿瘤转移的关系。

**方法:** 应用免疫组化技术检测64例新鲜结肠癌组织以及18例癌旁正常结肠黏膜组织中B7-H1的表达, 分析B7-H1的表达与结肠癌患者临床病理指标的关系。

**结果:** 结肠癌组织中有B7-H1蛋白的原位表达, 阳性表达率为48.44%, 而癌旁正常结肠黏膜组织中B7-H1蛋白阳性表达率为22.22%, 两者差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。B7-H1蛋白的阳性表达率与结肠癌的淋巴结转移有关( $P < 0.05$ ), 而与浸润深度、分化程度、临床分期等无关。

**结论:** B7-H1可作为一个预测结肠癌转移潜能的新的生物学指标。

**关键词:** B7-H1; 结肠癌; 淋巴结转移

刘书漫, 刘国红, 张钦宪, 刘占举. B7-H1在结肠癌组织中的表达及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17(8): 841-843  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/841.asp>

### ■背景资料

B7-H1分子是近年来发现的一种免疫共刺激分子, 主要表达在抗原提呈细胞上。B7-H1与其表达在淋巴细胞表面程序死亡受体PD-1结合后能诱导T细胞失功能和凋亡, 介导肿瘤免疫逃逸, 促进肿瘤生长, 在外周免疫耐受调节中发挥重要作用。本文是在我们课题组以往工作的基础上研究了结肠癌组织中B7-H1的表达, 探讨结肠癌组织中B7-H1的表达及其与肿瘤转移的关系。

### ■同行评议者

李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

## ■研发前沿

近年来,结肠癌的发病率逐渐升高,有些分化较好、发现较早的结肠癌手术时却已存在淋巴结转移,甚至远处转移,因此结肠癌早期转移的机制已成为当下的研究热点。

## 0 引言

B7-H1(PD-L1)是B7家族的一个新成员,其受体是PD-1。B7-H1与PD-1的相互作用抑制T细胞的增殖和细胞因子的分泌<sup>[1]</sup>。已经发现人的胃癌、急性淋巴细胞瘤等肿瘤组织中均有B7-H1的异常表达,且肿瘤细胞上表达的B7-H1在体外能介导抗原特异性T细胞的凋亡<sup>[2-4]</sup>。然而关于结肠癌组织中B7-H1的表达及其临床意义至今国内未见详细报道。近年来,结肠癌的发病率逐渐升高,且我们观察到这样一种现象:即有些分化较好、发现较早的结肠癌手术时却已存在淋巴结转移,甚至远处转移<sup>[5]</sup>。在此我们运用免疫组化方法研究了结肠癌组织中B7-H1的表达,并结合传统的临床病理指标,探讨其与结肠癌淋巴结转移之间的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集郑州大学第二附属医院2006-10/2008-02内镜以及手术切除的共64例新鲜结肠癌标本,其中18例手术切除的标本均取癌组织、癌旁组织(距癌组织>5 cm的正常组织)各1份,标本均经病理证实,新鲜组织标本立即用OCT胶包埋后入-80℃保存。患者年龄38-71岁,其中男43例,女21例,所有患者术前未接受化疗和(或)放疗。

**1.2 方法** 将用OCT胶包埋好的组织标本用恒冷冰冻切片机(American Optical HistoSTAT MicroTOME)-20℃下连续冠状切片,切成5 μm厚的冰冻切片,室温晾干后,入40 g/L多聚甲醛中固定,再用PBS冲洗。以下步骤按照Histostain-Plus Kit(晶美生物工程有限公司)说明书进行操作,依次经3 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>封闭内源性过氧化物酶,体积分数为100 g/L山羊血清封闭,滴加小鼠抗人B7-H1 mAb(1:100),4℃过夜。次晨依次加抗小鼠生物素化二抗和标记HRP链亲和素,DAB显色,苏木素复染细胞核。以PBS代替一抗作为阴性对照。每个标本随机观测10个高倍视野(400×),以细胞质中含大量粗大棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞,基本不含或无粗大棕黄色颗粒的细胞为阴性细胞。结肠癌组织中着色的B7-H1阳性细胞少于10%为B7-H1表达阴性,大于10%为表达阳性<sup>[6]</sup>。

**统计学处理** 应用SPSS12.0统计学软件对数据行 $\chi^2$ 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 不同结肠组织中B7-H1蛋白的表达** 免疫组

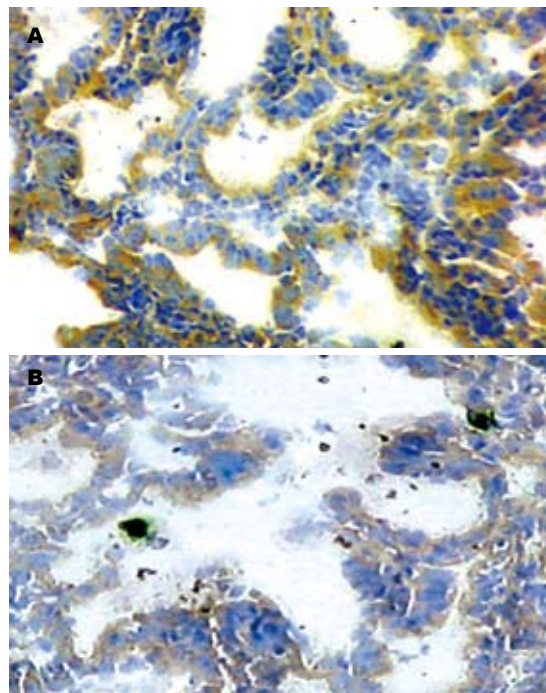


图1 结肠癌组织和结肠癌旁组织中B7-H1蛋白的表达(×400)。A: 结肠癌组织; B: 结肠癌旁组织。

织化学分析显示, B7-H1蛋白在结肠癌组织中呈阳性表达,阳性表达率为48.44%(31/64例),阳性染色位于结肠癌细胞的细胞膜和细胞质中,呈淡黄色至棕黄色细颗粒,细胞核不染色(图1);而B7-H1在结肠癌旁组织中表达较弱或者不表达,其阳性表达率仅为22.22%(4/18例),两者间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 B7-H1在结肠癌组织中的表达与临床病理指标的关系** 在64例结肠癌标本中,有淋巴结转移组B7-H1阳性表达25例(阳性率为65.79%),与淋巴结转移阴性组6例(阳性率为23.08%)比较有统计学意义( $P = 0.015$ ),而在结肠癌组织中B7-H1的表达与结肠癌的浸润深度、分化程度、临床分期等无关( $P > 0.05$ , 表1)。这表明, B7-H1的表达可能与结肠癌淋巴结转移有关。

## 3 讨论

肿瘤的发病机制目前尚不十分清楚,但是肿瘤发生上的免疫逃避机制是其发生的重要机制之一。近年来,围绕肿瘤细胞逃逸免疫的途径做了多方面的研究, B7家族是这方面研究的一个热点。B7-H1是近年发现的B7家族的新成员之一,其对调节T细胞和B细胞反应有很明显的效应<sup>[7]</sup>。研究证实, B7-H1除了在淋巴组织表达外,还在非淋巴组织表达<sup>[8]</sup>,且B7-H1在非淋巴组织上的表达可以调节外周器官中T细胞和B细胞的免疫

## ■相关报道

国内外有学者发现B7-H1在胃癌、食管癌、肝癌等恶性肿瘤组织中异常表达,并且诱导肿瘤细胞逃避免疫攻击,促进肿瘤生长,然而关于结肠癌组织中B7-H1的表达及其与淋巴结转移的关系至今国内未见详细报道。

表 1 B7-H1在结肠癌组织中的表达与临床病理指标的关系

病理类型	n	阳性数	阳性率(%)	P值
组织类型				
癌组织	64	31	48.44	0.019
癌旁组织	18	4	22.22	
淋巴结转移				
有	38	25	65.79	0.015
无	26	6	23.08	
外侵程度				
黏膜或浅肌层	25	11	44.00	0.441
深肌层以上	39	20	51.28	
分化程度				
高-中分化	36	17	47.22	0.678
低分化	28	14	50.00	
临床分期				
I 期 + II 期	33	18	54.55	0.332
III 期 + IV 期	31	13	41.94	

反应和炎症反应。

以往虽有研究证实, B7-H1在体外可通过其抑制性受体PD-1抑制Th1为主的免疫反应, 从而在诱导T细胞凋亡和肿瘤免疫逃避中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。迄今尚未见B7-H1表达与肿瘤转移相关性的报道。存在早期淋巴结转移是临床上近年来发现的结肠癌的特点, 并对结肠癌患者的愈后影响很大, 我们迫切需要揭开结肠癌淋巴结转移的机制。

本研究结果表明, B7-H1蛋白在结肠癌组织中的阳性表达率显著高于其在结肠癌旁组织中的阳性表达率, 结合以前在其他肿瘤中的报道<sup>[2-4]</sup>, 提示B7-H1确实参与了结肠癌的发生。且发现, B7-H1在伴有淋巴结转移的结肠癌组织中的表达要比未发生淋巴结转移的结肠癌组织中含量明显升高, 其发生机制可能与B7-H1的受体PD-1或者另外一个非PD-1受体在淋巴结中的特异性高表达有关<sup>[7]</sup>。

若要证明我们的假设, 尚需设计试验检测筛查PD-1或者非PD-1受体在结肠癌患者转移淋

巴结中的表达情况。如果假设得到证实, 我们认为针对B7-H1/PD-1可设计相应的抗体从而阻断PD-1与B7-H1的结合, 减少其淋巴结转移, 又因为B7-H1在机体外周免疫耐受中发挥重要的作用<sup>[1]</sup>, 似乎针对PD-1的抗体在未来更具有可行性。这些都为我们下一步的试验指明了方向。

#### 4 参考文献

- Blank C, Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 739-745
- Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, Greenfield EA, Freeman GJ. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 2003; 170: 1257-1266
- Liu SM, Meng Q, Zhang QX, Wang SD, Liu ZJ, Zhang XF. [Expression and significance of B7-H1 and its receptor PD-1 in human gastric carcinoma] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2008; 30: 192-195
- Chen X, Liu S, Wang L, Zhang W, Ji Y, Ma X. Clinical significance of B7-H1 (PD-L1) expression in human acute leukemia. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 622-627
- 王莉娟, 王贵吉, 牛虹, 邢鑫. 结肠癌组织中趋化因子受体CXCR4和基质金属蛋白酶MMP-2的表达及意义. *肿瘤基础与临床* 2007; 20: 134-136
- Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, Sengupta S, Frank I, Parker AS, Zincke H, Blute ML, Sebo TJ, Cheville JC, Kwon ED. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res* 2006; 66: 3381-3385
- Wang S, Bajorath J, Flies DB, Dong H, Honjo T, Chen L. Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J Exp Med* 2003; 197: 1083-1091
- Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, Sharpe AH. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2706-2716
- Stanciu LA, Bellettato CM, Laza-Stanca V, Coyle AJ, Papi A, Johnston SL. Expression of programmed death-1 ligand (PD-L) 1, PD-L2, B7-H3, and inducible costimulator ligand on human respiratory tract epithelial cells and regulation by respiratory syncytial virus and type 1 and 2 cytokines. *J Infect Dis* 2006; 193: 404-412

#### ■同行评价

本文探讨结肠癌组织中B7-H1表达与肿瘤生物学行为的关系, 有重要临床意义。

编辑 李军亮 电编 何基才



# 低分子肝素治疗消化系肿瘤合并深静脉血栓患者63例

熊慧华, 石磊, 杨林, 胡广原

## ■背景资料

深静脉血栓(DVT)是常见的、严重威胁恶性肿瘤患者生命的并发症之一,而消化系肿瘤较其他部位的肿瘤更易合并DVT。既往对恶性肿瘤患者并DVT的维持治疗主要采用华法林治疗,但仍有20%-30%的患者出现血栓复发,且华法林需要频繁监测INR,患者依从性差。

熊慧华, 石磊, 杨林, 胡广原, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心 湖北省武汉市 430030

作者贡献分布: 此课题由熊慧华及胡广原设计; 研究过程由熊慧华, 石磊, 杨林及胡广原完成; 研究所用分析工具由熊慧华提供; 数据分析由熊慧华及石磊完成; 本论文写作由熊慧华、石磊及胡广原完成。

通讯作者: 胡广原, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心。

huguangyuan@medmail.com.cn

电话: 027-63556273

收稿日期: 2008-11-27 修回日期: 2009-02-12

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-18

## Treatment with low-molecular-weight heparin for deep venous thrombosis complicated with digestive tract cancer: an analysis of 63 cases

Hui-Hua Xiong, Lei Shi, Lin Yang, Guang-Yuan Hu

Hui-Hua Xiong, Lei Shi, Lin Yang, Guang-Yuan Hu, Cancer Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Guang-Yuan Hu, Cancer Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. huguangyuan@medmail.com.cn

Received: 2008-11-27 Revised: 2009-02-12

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-18

## Abstract

**AIM:** To compare therapeutic efficacy of long-term low-molecular-weight heparin treatment with routine Warfarin treatment for digestive tract cancer complicated with deep venous thrombosis.

**METHODS:** Sixty three digestive tract cancer patients complicated with deep venous thrombosis were retrospectively allotted from February 2005 to December 2006 either into long-term low-molecular-weight heparin treatment group (LMWH group) or into warfarin treatment group (routine care group). The bleeding rate, the rates of recurrent venous thromboembolism and the platelet counts of patients of both groups were analyzed.

**RESULTS:** In long-term LMWH group, bleeding occurred in 6 patients (18.8%) and the plate-

let count of 1 patient (3.1%) decreased below normal level, which did not show significant difference compared with routine care group (25.8% and 6.5%, respectively). However, at 12 months, recurrent venous thromboembolism occurred in 3 of 32 cases (9.4%), which showed significant difference compared with routine care group (29.0%,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Long-term low-molecular-weight heparin, more convenient and more effective than routine warfarin therapy, is considered to be more effective for digestive tract cancer complicated with deep venous thrombosis.

**Key Words:** Deep venous thrombosis; Anticoagulation; Low-molecular-weight heparin

Xiong HH, Shi L, Yang L, Hu GY. Treatment with low-molecular-weight heparin for deep venous thrombosis complicated with digestive tract cancer: an analysis of 63 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(8): 844-847

## 摘要

**目的:** 观察低分子肝素钠(LMWH)和常规华法林维持治疗消化系恶性肿瘤合并深静脉血栓形成(DVT)患者的疗效。

**方法:** 回顾性分析我院2005-02/2006-12恶性消化系肿瘤合并DVT患者病例资料, 比较两组患者的出血发生率、血小板数值变化和血栓再发生率。

**结果:** LMWH组患者治疗3 mo内出血发生率为18.8%, 3.1%患者出现血小板低于正常值; 常规治疗组在治疗3 mo内出血发生率为25.8%, 6.5%患者出现血小板低于正常值, 二组差异均无显著性。但LMWH组在治疗12 mo血栓再发生率为9.4%, 常规治疗组为29.0%, 二者差异有显著性( $P < 0.05$ )。

**结论:** 对恶性消化系肿瘤合并DVT患者, 长期应用低分子肝素钠较华法林维持治疗更为方便有效、血栓复发率更低, 更为合理。

**关键词:** 深静脉血栓; 抗凝; 低分子肝素

## ■同行评议者

唐世刚, 教授, 中南大学湘雅三医院

熊慧华, 石磊, 杨林, 胡广原. 低分子肝素治疗消化系统肿瘤合并深静脉血栓患者63例. 世界华人消化杂志 2009; 17(8): 844-847  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/844.asp

## 0 引言

恶性肿瘤患者发生血栓栓塞性疾病, 特别是深静脉血栓(deep venous thrombosis, DVT)的危险性明显高于非肿瘤患者, 在胰腺癌、结肠癌等消化系统恶性肿瘤中发生静脉血栓的危险性甚至高达18%-26%<sup>[1-2]</sup>. 与非恶性肿瘤患者相比, 目前常采用的肝素加口服双香豆素类抗凝药(华法林)治疗效果不理想, 血栓复发及出血事件的发生率较高. 我院自2005年以来采用低分子肝素(low-molecular-weight heparin, LMWH)长期治疗消化系统恶性肿瘤合并深静脉血栓形成取得较好疗效, 现报道如下.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 回顾性分析我院2005-02/2006-12恶性消化系统肿瘤并DVT患者63例, 患者均经病理学确诊为消化系统恶性肿瘤, 均有临床症状(肢体肿胀、疼痛)并经彩色超声波检查证实DVT, 且均接受DVT维持治疗3 mo. 两组患者的年龄27-75岁, 中位年龄51.3岁, 男39例, 女24例, 其中结肠癌25例、胃癌11例、食管癌8例、胰腺癌5例、肝癌4例、直肠癌10例. 肿瘤期别: II期7例, III期29例, IV期27例. 全组DVT中22例发生于左下肢(左股静脉17例, 髂静脉13例), 31例发生于右下肢(右股静脉20例, 右髂静脉17例, 腘静脉1例), 3例发生于右上肢(右肘静脉2例, 右腋静脉1例), 2例发生于左上肢(左肘静脉), 发生于上腔静脉3例, 发生于下腔静脉6例. 单发DVT35例, 复合DVT28例. 根据维持治疗时所使用的药物的不同分为华法林组和低分子肝素钠组(长期LMWH组), 两组患者治疗前性别、年龄、肿瘤类型、期别及DVT分布差异均无显著性( $P>0.05$ ).

**1.2 方法** 两组患者均先予低分子肝素钠(希弗全, 先锋药业)4250 IU, sc, 每天1次, 共5 d. 长期华法林维持治疗(常规治疗)组: 在应用希弗全的第3天加用华法林 $po$ , 初始剂量为3-5 mg/d, 然后根据国际标准化比率(INR)调节剂量, 口服华法林的疗程为3 mo. 长期LMWH组: 继续给予低分子肝素钠(希弗全, 先锋药业), 4250 IU sc, 每天1次, 连用3 mo. 观察指标: (1)出血现象: 局部瘀点、瘀斑不需停药, 热敷, 若广泛皮下出血则停药; (2)血小板和PT, APTT; (3)每3 mo随访1次患者,

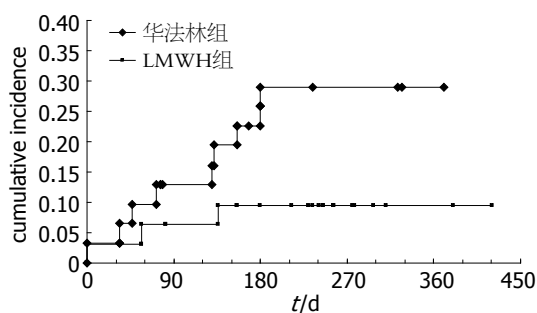


图1 消化系统恶性肿瘤合并深静脉血栓患者的血栓再发率.

随访1年, 了解有无再发血栓.

**统计学处理** 两组间3 mo内的出血和血小板减少等事件的比较用 $\chi^2$ 检验. 12 mo累积血栓再发率由Kaplan-Meier曲线计算得到, 二组间比较经Log-rank检验, 均以 $P<0.05$ 为有统计学差异, SPSS13.0统计软件进行统计分析.

## 2 结果

**2.1 不良反应** LMWH治疗组32例患者中, 6例出现出血现象(18.8%), 均为小出血. 而华法林维持治疗组31例患者中, 8例出现了出血现象(25.8%), 其中7例为小出血(22.6%), 1例为大出血(3.2%). 经 $\chi^2$ 检验, 二组间出血和大出血的发生率差异无显著性( $P>0.05$ ). LMWH治疗组中有1例患者(3.1%)出现血小板少于 $100 \times 10^9/L$ , 而华法林治疗组中有2例(6.5%)患者出现血小板少于 $100 \times 10^9/L$ , 二组间血小板减少的发生率差异无显著性( $P>0.05$ ).

**2.2 再发血栓形成** 长期LMWH组32例患者中, 3例出现再发血栓事件, 血栓再发率为9.4%, 明显低于常规华法林治疗组, 后者31例患者中有9例(29.0%)再次发生血栓, 二组间比较经log-rank检验, 差异有显著性( $P=0.047$ , 图1).

## 3 讨论

Armand Trousseau最早于1865年就观察到恶性肿瘤与血栓栓塞事件的发生密切相关, 并且血栓常可作为隐性癌的临床征象出现. 1878年Biuroth发现在血栓中存在恶性肿瘤细胞, 进一步说明二者之间关系紧密. 目前与肿瘤相关的各种静脉、动脉及其他血栓栓塞性疾病均称为Trousseaus综合征<sup>[3]</sup>. Iodice *et al*对1982-2007年所发表的12篇有关血栓栓塞与恶性肿瘤危险性的文献进行分析, 发现有血栓栓塞性疾病患者出现恶性肿瘤的风险是未出现血栓性疾病患者的3.2倍. 而对另外28篇有关恶性肿瘤合并血栓栓

## ■ 研发前沿

目前有关低分子肝素(LMWH)在恶性肿瘤中的应用已成为研究热点. 与华法林相比, LMWH能否降低血栓再发率、减少并发症? 能否延长患者的生存时间? 这些都是值得探讨的问题.

## ■ 相关报道

恶性肿瘤患者发生血栓栓塞性疾病, 特别是深静脉血栓的危险性明显高于非肿瘤患者, 在胰腺癌、结肠癌等消化系统恶性肿瘤中发生静脉血栓的危险性甚至高达18%-26%. Khorana *et al*发现肿瘤原发部位与血栓栓塞发病密切相关, 其中原发部位来源于胰腺者占8.1%, 来源于结直肠癌者占7.5%, 来源于胃者占4.9%.

## ■创新盘点

目前对恶性肿瘤合并DVT的维持治疗的探讨,国内研究甚少。本文采用回顾性分析的方法比较了低分子肝素和华法林在消化系恶性肿瘤合并深静脉血栓患者的维持治疗中的疗效和不良反应,观察到低分子肝素长期维持治疗组的血栓再发生率明显降低,而不良反应并未增加,提示低分子肝素维持治疗消化系恶性肿瘤合并DVT更有效,更合理。

## ■名词解释

深静脉血栓形成(DVT):指纤维蛋白、血小板、红细胞等血液成分在深静脉内不正常地凝结,阻塞管腔,导致静脉回流障碍。

塞性疾病患者的Meta分析,发现除血液肿瘤和卵巢癌外,消化系恶性肿瘤患者较其他部位肿瘤患者更易合并血栓栓塞性疾病,如胰腺癌患者罹患血栓栓塞性疾病的风险增加6.1倍,肝癌患者为5.6倍,而结直肠癌和胃癌患者出现血栓栓塞性疾病的风险则增加约3倍<sup>[4]</sup>。Khorana *et al* 也发现肿瘤原发部位与血栓栓塞发病密切相关,其中原发病灶来源于胰腺者占8.1%,来源于结直肠者占7.5%,来源于胃者占4.9%<sup>[5]</sup>。

恶性肿瘤相关血栓栓塞在临床上可呈多种形式,如深静脉血栓、肺栓塞、游走性浅表血栓性静脉炎等。在实体肿瘤中,静脉血栓栓塞特别是深静脉血栓最为常见,后者又以下肢为好发部位,本研究共63例恶性消化系肿瘤合并DVT患者,发生于下肢者为53例(84.1%),与文献报道相似<sup>[5]</sup>。恶性肿瘤相关的静脉血栓较为复杂,一方面取决于肿瘤细胞与机体凝血、抗凝、纤溶系统的相互作用,另一个方面取决于患者的体质与治疗,目前认为与以下几个因素有关:(1)肿瘤所致的血液高凝状态:肿瘤细胞可合成释放促凝血因子如组织因子、癌促凝血因子等,肿瘤细胞还可表达与纤溶系统相关的一些蛋白导致纤溶活性受损。此外,肿瘤患者还伴有细胞因子紊乱,这些因素均可导致恶性肿瘤患者的高凝状态。(2)肿瘤细胞与内皮细胞、血小板、单核-巨噬细胞之间相互作用,激活凝血过程。(3)血管壁损伤:肿瘤细胞可直接或间接通过分泌一种血管通透因子,使微血管通透性增加,手术和化疗药物还可加重血管内皮细胞的损伤。(4)肿瘤患者机体抗凝系统异常:肿瘤患者的抗凝血酶III、蛋白质S和蛋白质C水平均明显下降,机体抗凝活性降低,若有肝转移肝功能损害时,则会进一步加重血栓形成的风险。(5)静脉血流淤滞:肿瘤患者长期卧床、活动减少或因肿块压迫血管导致血流速度减慢,血液黏滞度增加<sup>[6]</sup>。Kolomansky *et al*对以色列Rambam医疗中心一年所收治的恶性肿瘤合并血栓患者进行分析,发现直肠癌患者占11%,胰腺癌患者占10%,且III期、IV期患者的比例为63%。而对这些患者的血栓风险因素进一步分析发现,除恶性肿瘤因素外,在引起深静脉血栓的致病因素中长期卧床因素占33%;手术外伤占20%;充血性心力衰竭占17%,中央静脉插管因素占13%<sup>[7]</sup>。Heit *et al*报道,在血栓栓塞性疾病的各危险因素中,恶性肿瘤使发病风险增加4倍,而化学治疗使发病风险增加6倍<sup>[8]</sup>。Khorana *et al*发现年龄大

于65岁、女性、接受化学治疗以及肿瘤原发部位等均是发生血栓栓塞的高危因素<sup>[5]</sup>。本研究63例恶性消化系合并DVT患者中,III期、IV期患者占88.9%,且所有患者至少合并手术、化疗、中央静脉插管以及长期卧床等发生血栓高危因素中的一项,与文献报道类似。进一步分析,消化系恶性肿瘤由于手术一般情况下要求切口大,创伤大,操作时间较长,术中失血多、手术易造成术区组织的动、静脉损伤和血肿压迫,术后长期卧床不动,患者常使用中央静脉插管以及化疗等,因此血栓发生率较高。而DVT如未得到及时和适当的治疗易发展为血栓形成后综合征,引起患肢肿胀、溃疡和坏疽,甚至发生肺栓塞,因此与恶性消化系肿瘤相关的深静脉血栓问题逐渐引起人们的广泛关注。

恶性肿瘤患者合并深静脉血栓治疗原则与非肿瘤者相似。对深静脉血栓的急症治疗方法是首先皮下注射低分子质量肝素(LMWH)或普通肝素。而在长期维持抗凝治疗方面,传统治疗方法是口服双香豆素类抗凝药(华法林)以预防深静脉血栓复发。华法林通过抑制维生素K依赖的凝血因子合成而发挥抗凝作用,同时也可抑制维生素K依赖的抗凝血因子蛋白C、蛋白S,口服时间至少3 mo,在治疗期间需监测国际标准化比值(INR)的目标值为2-3。由于双香豆素类抗凝药(华法林)起效时间长且半衰期长,其抗凝作用多需3-5 d才消失。此外该药物的药代动力学易受其他药物、食物、体内维生素K水平、肝功能状况等许多因素的影响,治疗窗窄需频繁检测INR水平。而恶性肿瘤患者特别是消化系恶性肿瘤患者由于胃肠道本身吸收障碍,且易并发营养差、感染、伴随疾病以及肝功能损害等情况,直接导致INR难以维持在目标水平。对于某些需要定期进行有创操作检查或化疗所致血小板减少的肿瘤患者,华法林治疗安全性也较差。因需频繁监测国际标准化比值(INR)的目标值,恶性肿瘤患者的生活质量明显受影响,临床上药物依从性明显下降。Lee *et al*报道,恶性肿瘤合并静脉血栓栓塞的患者,长期使用华法林及其衍生物的抗凝治疗疗效和安全性均不理想,其抗凝治疗后血栓再复发比率较高,抗凝药物诱导出血和血小板减少的发生率均高于非肿瘤者<sup>[9]</sup>。Prandoni *et al*对静脉血栓患者采用华法林维持治疗,发现在恶性肿瘤合并静脉血栓的患者中血栓再发率为21%,出血发生率为12%,也明显高于非肿瘤患者,因此有学者认为恶性肿瘤合

并血栓患者长期口服抗凝药物治疗目前存在较大的争议, 甚至对这些患者基本无效<sup>[10-11]</sup>。

普通肝素的副作用之一就是血小板减少(肝素诱导血小板减少症, Heparin induced thrombocytopenia, HIT), 发生率约为5%, 临床主要表现血小板计数减少, 出血风险增加。LMWH是由普通肝素通过化学方法或酶解聚而得到的小分子质量片段, 仅保留抗凝血因子Xa的作用, 其抗Xa因子作用强, 抗凝血酶作用弱, 抗凝效果呈明显的剂效关系, 对血小板功能影响较小, 血小板减少的发生罕见, 仅1%。本研究低分子肝素组中仅1例出现血小板减少, 其诱发血小板减少的发生率虽高于文献报道LMWH诱发血小板减少发生率(考虑与病例数目较少有关), 但低于文献报道的普通肝素发生率<sup>[11]</sup>, 提示低分子肝素使用安全, 个体差异小, 大部分患者可使用同一剂量, 每日皮下给药, 且在治疗中无需监测INR, 甚至可在家治疗。Hull *et al*对200例恶性肿瘤合并近端静脉血栓的患者分别采用LMWH治疗和常规华法林治疗, 结果发现, LMWH组的血栓再发率为7%, 而常规华法林治疗组的血栓再发率为16%, 两组间的出血发生率却无明显差异<sup>[12]</sup>。本研究通过对比观察低分子肝素和华法林在消化系统恶性肿瘤合并深静脉血栓患者长期维持治疗中的作用和安全性, 发现LMWH组在治疗12 mo时血栓再发率为9.4%, 明显低于常规治疗组, 但是出血和血小板减少等副反应未见明显增加, 提示在消化系统恶性肿瘤合并DVT患者中, 采用低分子质量肝素长期维持治疗更为有效, 更方便, 合理, 与传统的华法林维持治疗相比, 其副作用未明显增加, 但可明显降低血栓再发率。

#### 4 参考文献

- 1 Lee AY. Epidemiology and management of venous thromboembolism in patients with cancer. *Thromb Res* 2003; 110: 167-172
- 2 Mandalà M, Reni M, Cascinu S, Barni S, Floriani I, Cereda S, Berardi R, Mosconi S, Torri V, Labianca R. Venous thromboembolism predicts poor prognosis in irresectable pancreatic cancer patients. *Ann Oncol* 2007; 18: 1660-1665
- 3 Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007; 110: 1723-1729
- 4 Iodice S, Gandini S, Löhr M, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Venous thromboembolic events and organ-specific occult cancers: a review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 781-788
- 5 Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Frequency, risk factors, and trends for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients. *Cancer* 2007; 110: 2339-2346
- 6 Linnemann B, Schmidt H, Schindewolf M, Erbe M, Zgouras D, Grossmann R, Schambeck C, Lindhoff-Last E. Etiology and VTE risk factor distribution in patients with inferior vena cava thrombosis. *Thromb Res* 2008; 123: 72-78
- 7 Kolomansky A, Hoffman R, Sarig G, Brenner B, Haim N. Prospective evaluation of patients hospitalized with venous thromboembolism: comparison between cancer and non-cancer patients. *Isr Med Assoc J* 2006; 8: 848-852
- 8 Heit JA, Silverstein MD, Mohr DN, Petterson TM, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 809-815
- 9 Lee AY, Rickles FR, Julian JA, Gent M, Baker RI, Bowden C, Kakkar AK, Prins M, Levine MN. Randomized comparison of low molecular weight heparin and coumarin derivatives on the survival of patients with cancer and venous thromboembolism. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2123-2129
- 10 Prandoni P, Lensing AW, Piccioli A, Bernardi E, Simioni P, Girolami B, Marchiori A, Sabbion P, Prins MH, Noventa F, Girolami A. Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood* 2002; 100: 3484-3488
- 11 Nishioka J, Goodin S. Low-molecular-weight heparin in cancer-associated thrombosis: treatment, secondary prevention, and survival. *J Oncol Pharm Pract* 2007; 13: 85-97
- 12 Hull RD, Pineo GF, Brant RF, Mah AF, Burke N, Dear R, Wong T, Cook R, Solymoss S, Poon MC, Raskob G. Long-term low-molecular-weight heparin versus usual care in proximal-vein thrombosis patients with cancer. *Am J Med* 2006; 119: 1062-1072

#### ■同行评价

本文具有一定的临床实用价值和相应的科学性。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕



## 致谢世界华人消化杂志编委

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

蔡开琳 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院普通外科

曹秀峰 主任医师

南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

陈耀凯 副教授

中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所

戴朝六 教授

中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

丁惠国 主任医师

首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

范建高 教授

上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

房林 副教授

同济大学附属上海市第十人民医院普外科

高泽立 主任医师

上海交通大学医学院附属第九人民医院周浦分院消化科

戈之铮 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

何超 教授

浙江大学医学院附属邵逸夫医院肛肠外科

黄恒青 主任医师

福建省第二人民医院消化内科

季加孚 教授

北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院外科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

刘作金 副教授

重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

秦环龙 教授

上海交通大学附属第六人民医院外科

沈薇 教授

重庆医科大学附属第二医院消化内科

石统东 副教授

重庆医科大学附属第二医院感染病科

唐晓鹏 教授

中南大学肝病研究所/中南大学湘雅二医院感染科

田晓峰 教授

大连医科大学附属第二医院

王健生 教授

西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王鲁 副教授

复旦大学附属中山医院肝外科复旦大学肝癌研究所

王文跃 主任医师

中日友好医院普通外科

王振宁 教授

中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

肖恩华 教授

中南大学湘雅二医院放射教研室

伊力亚尔·夏合丁 教授

新疆医科大学第一附属医院胸外科

张晓岚 教授

河北医科大学第二医院消化内科

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

张占卿 主任医师

上海市(复旦大学)公共卫生中心

周晓武 副主任医师

中国人民解放军空军总医院普通外科