ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志

世界华人消化杂志®

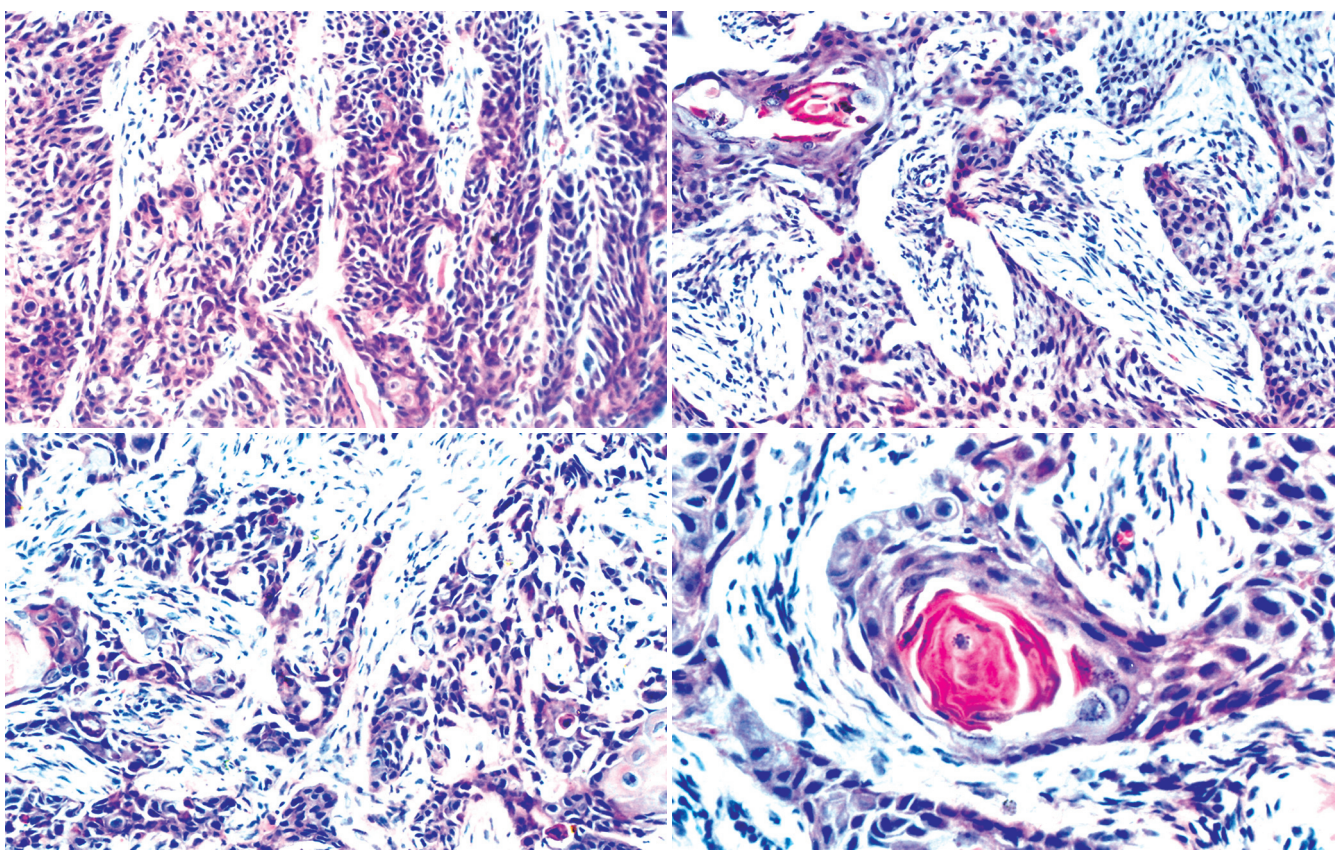
WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008 年 10 月 8 日　第 16 卷　第 28 期　(Volume 16 Number 28)

www.wjgnet.com

二零零八年十月八日　第十六卷　第二十八期



28 / 2008

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

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
裘法祖教授
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
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

成军教授
程英升主任医师
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
白文元教授
苌新明教授
陈洪副教授
陈军贤主任医师
陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
陈玉林教授
程斌副教授
迟宝荣教授
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
冯红主任医师
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关晓辉主任医师
关玉盘教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
洪天配教授
侯晓华教授
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
黄裕新教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
金懋林教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李继强教授
李淑德教授
李晓宇主任医师
李延青教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马金城教授
马欣主任医师
毛高平主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴熙绪主任医师
朴云峰教授
秦成勇教授
曲智威副主任医师
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
宋于刚教授
孙富强副教授
孙侃教授
孙自勤教授
唐采白副教授
唐芙爱教授
唐丽安教授
田德安主任医师
童强主任医师
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王吉耀教授
王莉瑛教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
吴萍主任医师
夏时海副教授
徐秀英副教授
许春舫主任医师
许乐主任医师
许亚平副教授
杨冬华教授
杨建民教授
杨希山教授
杨幼林主任医师
杨云生教授
杨昭徐教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
于红刚副教授
于晓峰主任医师
袁伟建教授
展玉涛副主任医师
张春清教授
张方信主任医师
张国梁主任医师
张吉翔教授
张集昌主任医师
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
赵晓晏教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
朱人敏教授
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
陈建荣副教授
陈克能主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凛教授
陈强谱教授
陈亚军主任医师
陈知水教授
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
迟强教授
仇毓东副教授
崔彦教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅廷亮教授
傅志仁主任医师
高成新教授
葛海燕教授
龚建平教授
巩鹏教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
郭克建教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何生教授
何裕隆教授
何振平教授
黄志勇副教授
季加孚教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
兰平教授
黎乐群教授
李国威教授
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
李小荣教授
李旭副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
刘建教授
刘颖斌副教授
刘志苏教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
吕明德教授
吕云福教授
梅铭惠教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
彭志海教授
钱建民教授
乔岐禄主任医师
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦仁义教授
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

裘正军教授
任建安教授
荣大庆教授
邵永孚教授
沈柏用副教授
沈世强教授
沈岩主任医师
师英强教授
施诚仁教授
宋世兵主任医师
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙家邦教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邰升副教授
谭群友副教授
汤恢焕教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王要军教授
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
卫洪波教授
吴德全教授
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
席启主任医师
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐智教授
许戈良教授
严律南教授
严以群主任医师
杨广顺教授
杨维良教授
杨尹默教授
伊力亚尔•夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于恩达教授
于健春教授
于良副教授
于则利教授
郁宝铭教授
郁正亚副教授
曾勇教授
张柏和教授
张群华教授
张水军教授
张肇达教授
张宗明教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
钟德玠教授
周丁华主任医师
周伟平教授
朱立元教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松副研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
党双锁副教授
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
郝春秋副教授
何生松教授
江家骥教授
李智伟教授
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
孟庆华教授
宁琴教授
牛俊奇教授
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
唐霓副研究员
唐世刚教授
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
谢青教授
徐小元教授
宣世英教授
闫惠平研究员
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
赵桂珍教授
赵连三教授
周伯平教授
周文兴教授
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
劳绍贤教授
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
牛建昭教授
沈洪教授
唐旭东主任医师
唐志鹏研究员
王新月教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

白玉贤教授
曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
马力文主任医师
吴晴教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

陈克敏教授
程红岩教授
褚建国主任医师
官泳松教授
韩新巍教授
胡红杰主任医师
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
扬业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
刘海峰主任医师
潘林娜教授
沈俊教授
孙明军教授
万军教授

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
倪才方教授
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授
刘鲁明教授
唐文富副主任医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员
高峰教授
高英堂研究员
管冬元副教授
黄文林教授
李东辉教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
孙秀发教授
谭学瑞教授
屠红副研究员
汪思应教授
吴晓东教授
夏建川研究员
徐存拴教授
徐德忠教授
徐宁志研究员
徐迎新研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赖宏研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周士胜教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
左国营副主任药师

消化病理学

杜祥教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
阎晓初副教授
易永芬教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2008 年 10 月 8 日　第 16 卷　第 28 期　(总第252期)

述　评

3135 胃肠道微生态学中西医结合研究进展
张声生, 杨静

基础研究

3139 启膈散及其拆方对人食管癌Eca109细胞裸鼠移植瘤血管生成的抑制作用
司富春

3146 大鼠Smad7真核表达质粒的构建及在肝星状细胞中的表达
杨小艳, 杨勇, 郑勇, 李睿, 周婷, 孙侃, 常向云, 陈卫刚

3152 肝细胞生长因子对肝细胞癌侵袭和转移的影响
王庆军, 孙抒, 李宏丹, 魏嘉, 苏荣健

3157 人巨细胞病毒先天性潜伏感染再激活致小鼠肠炎
吴琼, 王明丽, 黄维, 赵俊, 胡雪影, 黎锐平

临床研究

3162 TGF-β1引发的上皮-间质转化与食管鳞癌浸润转移的关系
张红燕, 孙洋, 李珊珊, 杨建萍, 阎爱华, 王新华, 王小军

3167 CD133、Ki-67在胃癌的表达及临床病理意义
李亚卓, 王凤华, 赵坡

焦点论坛

3172 肠黏膜免疫系统调节异常导致炎症性肠病发生
刘占举, 申民强, 任宏宇, 邹开芳, 刘丽娜, 梁丽娜, 白爱平, 黄美兰, 冉志华, 王晓娣, 张德奎, 甘华田, 吴小平, 欧阳春晖

3173 炎症性肠病患者NK细胞激活和效应应答
申民强, 刘占举

3178 炎症性肠病肠黏膜组织内淋巴细胞激活和效应应答
任宏宇, 邹开芳

3181 炎症性肠病与肠黏膜免疫调节细胞
刘丽娜, 梁丽娜

3187 炎症性肠病肠黏膜屏障损伤机制
白爱平

3192 肠道抗原识别与炎症性肠病
黄美兰, 冉志华

3197 炎症性肠病患者肠黏膜组织细胞凋亡
王晓娣

3200 重视研究肠道神经系统在炎症性肠病发病中作用
张德奎, 甘华田

3204 防御素与炎症性肠病
吴小平, 欧阳春晖

文献综述

3208 激光诱发自体荧光光谱联合内镜技术在肿瘤诊断中的应用
肖寒, 朱焯炜

研究快报

3211 声学密度定量技术对脂肪肝变性程度的分析
沈卫东, 邹大中, 刘鹏飞, 陈宏林

3215 双虎清肝颗粒对四氯化碳诱发大鼠肝纤维化的防治作用
赵建学, 郭海燕, 陆玮婷, 邵铭

3221 RANTES在肝肾联合移植排斥反应中的表达及意义
杨芳, 江艺, 蔡秋程, 郑智勇, 宋屿娜, 吕立志

3225 TGFβ1对BxPC-3胰腺癌细胞周期基因表达的影响
钟良, 陈坚, 蒋义斌, 孙大裕

临床经验	3230 肝硬化患者Ghrelin、生长激素释放素的变化及其临床意义 王淑珍, 尚宏伟, 王兴翠, 李冰, 张斌, 丁惠国 3234 内镜下胆道支架置入术治疗恶性胆道梗阻122例 黄晓东, 范彦, 张姮, 刘文敏, 刘小明 3238 结直肠癌淋巴结的分期 彭开勤, 邵永胜, 张应天, 吴文良, 刘文 3242 器官功能不全患者行胶囊内镜检查的肠道准备 徐龙, 吕农华, 朱萱, 徐萍, 陈幼祥, 祝荫, 何怀纯, 华开罗
病例报告	3246 溃疡性结肠炎合并甲状腺功能亢进症1例 陈文科, 邹兵, 叶红军, 张智翔
致　　谢	3248 致谢世界华人消化杂志编委
消　　息	3145 世界华人消化杂志栏目设置 3156 世界华人消化杂志正文要求 3166 世界华人消化杂志作者署名要求 3177 世界华人消化杂志标点符号用法 3186 世界华人消化杂志名词术语标准 3191 世界华人消化杂志英文摘要要求 3220 世界华人消化杂志修回稿须知 3229 世界华人消化杂志被收录情况 3237 世界华人消化杂作者贡献及同行评议公开政策 3241 世界华人消化杂志网络版的发表前链接
封面故事	司富春. 启膈散及其拆方对人食管癌Eca109细胞裸鼠移植瘤血管生成的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3139-3145 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3139.asp
本期责任人	编务 李慧; 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; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

世界華人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名

(旬刊)

创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2008-10-08
原刊名 新消化病学杂志

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
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

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
http://www.wjgnet.com
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
http://www.wjgnet.com
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044，北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界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
http://www.wjgnet.com

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.

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

特别声明

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

2008年版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元　全年864.00元	1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

October 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 28

EDITORIAL

3135 Progress in gastrointestinal micro-ecology in integration of traditional Chinese medicine and Western medicine
Zhang SS, Yang J

BASIC RESEARCH

3139 Inhibitory effect of *Qigesan* and its separated formula on angiogenesis of esophageal carcinoma Eca109 cell-transplanted nude mouse tumor
Si FC

3146 Construction of eukaryotic expression vector for rat Smad7 and its expression in hepatic stellate cell line HSC-T6
Yang XY, Yang Y, Zheng Y, Li R, Zhou T, Sun K, Chang XY, Chen WG

3152 Effect of hepatocellular growth factor on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma
Wang QJ, Sun S, Li HD, Wei J, Su RJ

3157 Enteritis induced by reactivation of congenital latent infection of human cytomegalovirus in mice
Wu Q, Wang ML, Huang W, Zhao J, Hu XY, Li RP

CLINICAL RESEARCH

3162 Relationship between TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition and infiltration, metastatis of esophageal squamous cell carcinoma
Zhang HY, Sun Y, Li SS, Yang JP, Yan AH, Wang XH, Wang XJ

3167 Expressions of CD133 and Ki-67 in gastric carcinoma and their clinicopathologic significances
Li YZ, Wang FH, Zhao P

HIGHLIGHT TOPIC

3172 Dysregulation of intestinal mucosal immune system causes inflammatory bowel disease
Liu ZJ, Shen MQ, Ren HY, Zou KF, Liu LN, Liang LN, Bai AP, Huang ML, Ran ZH, Wang XD, Zhang DK, Gan HT, Wu XP, Ouyang CH

3173 NK cell activation and immune response in inflammatory bowel disease
Shen MQ, Liu ZJ

3178 Intestinal mucosal lymphocyte activation and effective response in inflammatory bowel disease
Ren HY, Zou KF

3181 Relationship between inflammatory bowel disease and immuno-regulatory cells in intestinal mucosa
Liu LN, Liang LN

3187 Intestinal barrier injury in inflammatory bowel disease
Bai AP

3192 Recognition of luminal bacterial antigens in inflammatory bowel disease
Huang ML, Ran ZH

3197 Apoptosis in bowel mucosal tissues of patients with inflammatory bowel disease
Wang XD

3200 Emphasis on the role of intestinal nervous system in the pathogenesis of inflammatory bowel disease
Zhang DK, Gan HT

3204 Defensin and inflammatory bowel disease
Wu XP, Ouyang CH

REVIEW

3208 Application of laser induced auto-fluorescence spectrum in the diagnosis of cancer
Xiao H, Zhu ZW

RAPID COMMUNICATION

3211 Acquisition densitometry for fatty liver grading
Shen WD, Zou DZ, Liu PF, Chen HL

3215 Efficacy of Shuanghu liver-clearing granule in prevention and treatment of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats
Zhao JX, Guo HY, Lu WT, Shao M

3221 Expression and significance of RANTES in rejection of combined liver-kidney transplantation in rats
Yang F, Jiang Y, Cai QC, Zheng ZY, Song YN, Lv LZ
3225 Effect of transforming growth factor β1 on cell cycle-associated genes in BxPC-3
Zhong L, Chen J, Jiang YB, Sun DY

CLINICAL PRACTICE

3230 Levels of ghrelin, GH, GRH and their clinical significances in patients with hepatitis B related liver cirrhosis
Wang SZ, Shang HW, Wang XC, Li B, Zhang B, Ding HG
3234 Endoscopic retrograde biliary drainage for 122 patients with malignant biliary obstruction
Huang XD, Fan Y, Zhang H, Liu WM, Liu XM
3238 A proposed lymph node staging system for colorectal cancer
Peng KQ, Shao YS, Zhang YT, Wu WL, Liu W
3242 Bowel preparation for capsule endoscopy in organ dysfunction patients
Xu L, Lv NH, Zhu X, Xu P, Chen YX, Zhu Y, He HC, Hua KL

CASE REPORT

3246 One-case analysis of ulcerative colitis co-existing with hyperthyroidism
Chen WK, Zou B, Ye HJ, Zhang ZX

ACKNOWLEDGMENT

3248 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Si FC. Inhibitory effect of *Qigesan* and its separated formula on angiogenesis of esophageal carcinoma Eca109 cell-transplanted nude mouse tumor.
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3139-3145
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3139.asp

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Hui Li* Review Editor: *Jun-Liang Li* Electronic Page Editor: *Ji-Cai He*
Editor-in-Charge: *Jun-Liang Li* English Language Editor: *Hai-Ning Zhang*
Proof Editor: *Hai-Ning Zhang* Layout Editor: *Lian-Sheng Ma*

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 October 8, 2008

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: wcjd@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: wcjd@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
© 2008 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. If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2008 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3135-3138
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

胃肠道微生态学中西医结合研究进展

张声生, 杨 静

张声生, 杨静, 首都医科大学附属北京中医医院消化中心 北京市 100010
张声生, 教授, 主任医师, 医学博士, 主要从事中西医结合消化病临床与实验研究.
国家中医药管理局消化重点学科及北京市中医消化特色诊疗中心资助项目, No. 国中医药2001-38
通讯作者: 张声生, 100010, 北京市东城区美术馆后街23号, 首都医科大学附属北京中医医院消化中心. zss2000@sohu.com
电话: 010-52176634 传真: 010-52176720
收稿日期: 2008-06-20 修回日期: 2008-07-14
接受日期: 2008-08-12 在线出版日期: 2008-10-08

Progress in gastrointestinal micro-ecology in integration of traditional Chinese medicine and Western medicine

Sheng-Sheng Zhang, Jing Yang

Sheng-Sheng Zhang, Jing Yang, Center of Digestive Disease, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100010, China
Supported by: the Key Digestive Disease Specialty of TCM Granted by State Administration of Traditional Chinese Medicine and Beijing Characteristic Diagnosis and Treatment Center of Digestive Diseases of TCM, No. 2001-38
Correspondence to: Professor Sheng-Sheng Zhang, Center of Digestive Disease, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, 23 Art Gallery Back Street, Dongcheng District, Beijing 100010, China. zss2000@sohu.com
Received: 2008-06-20 Revised: 2008-07-14
Accepted: 2008-08-12 Published online: 2008-10-08

Abstract

Micro-ecology is a branch of life sciences which studies the relationship between the normal micro-organism group and its host. There are massive micro-organisms in a human's body and 400-500 kinds of micro-organisms are residing in the gastrointestinal tract. These normal micro-organism groups play a huge role on human body's physical activities such as digestion, absorption, nutrition, immunity, *etc*. The development of micro-ecology provides a new perspective for our understanding of the nature of life and disease. The basic theories and viewpoints of micro-ecology have certain similarities to the theories of traditional Chinese medicine (TCM), such as holism, yin-yang theory, exuberance and debilitation of pathogical and healthy qi. Therefore, it has aroused the wide attention of Chinese medicine scholars. In recent decades, many scholars have explored the relationship between TCM and micro-ecology theoretically and practically and some progress has been made. This paper reviewed the progress in gastrointestinal micro-ecology in traditional Chinese medicine.

Key Words: Gastrointestinal Micro-ecology; Traditional Chinese medicine

Zhang SS, Yang J. Progress in gastrointestinal micro-ecology in integration of traditional Chinese medicine and Western medicine. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3135-3138

摘要

微生态学是研究正常微生物群与其宿主相互关系的生命科学分支. 人体内存在着大量的微生物, 仅胃肠道内就寄居着400-500种微生物, 这些正常微生物群在人体消化、吸收、营养、免疫等生理活动过程中发挥着巨大的作用. 微生态学的发展为我们认识生命和疾病的本质提供了全新的视角. 微生态学的一些基本理论观点与中医学理论如整体观念、阴阳学说、邪正盛衰等存在着某些相似之处, 因此引起了中医药学者的广泛关注. 近十几年来, 不少学者从理论和实践上去探索中医药学与微生态学的关系, 并取得一定进展, 本文就近十几年来中医学在胃肠道微生态领域的研究进展作一综述.

关键词: 胃肠道微生态; 中医学

张声生, 杨静. 胃肠道微生态学中西医结合研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3135-3138
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3135.asp

0 引言

微生态学是20世纪60-70年代兴起的一门新学科, 是现代生命科学的一个新分支, 他研究微生物与其宿主(人类、动物、植物) 之间的对立统一形成的生态系统的变化和规律. 人们发现, 微

■背景资料
微生态学是一门新兴科学, 其一些基本理论观点与中医学理论存在着某些相似之处, 因此引起了中医药学者的广泛关注. 近几十年来, 许多中医药学者从理论和实践上去探索中医药学与微生态学的关系, 为中医药学的研究开辟了新的思路, 也为中西医结合研究搭建了新的桥梁.

■同行评议者
唐文富, 副主任医师, 四川大学华西医院中西医结合科

■研发前沿
通过对相关文献的学习和比较, 微生态学的基本理论与中医药学理论如整体观念、阴阳学说、邪正盛衰等存在着相通之处, 大量的临床研究也显示中药具有调节微生态平衡的作用.

生态学的一些基本理论观点与中医学理论存在着某些相似之处. 近十几年来, 许多中医药学者从理论和实践上去探索中医药学与微生态学的关系, 为中医药学的研究开辟了新的思路, 也为中西医结合研究搭建了新的桥梁.

1 胃肠道微生态系统概况

1.1 胃肠道微生态系统的组成 在胃肠道微生态环境内寄居着400-500种微生物, 其中包括细菌、真菌和原生动物. 这些微生物的总质量约为1 kg, 其体积相当于1个人的肝脏, 其数量为10^{14}个, 而人体自身的细胞只有10^{13}个[1]. 定居于胃肠道的菌群按照对宿主的作用可分为3类[2]: (1)共生型: 为专性厌氧菌, 是肠道的优势菌群, 这些菌对宿主是有益无害的. (2)条件致病菌: 在正常情况下, 由于微生态环境的平衡状态, 这些细菌数量少, 不会致病, 而且是保持微生物群落生态平衡的必要组成部分, 但在病理情况下, 其数量异常增多, 就可致病. (3)病源菌: 大多为外籍菌群, 长期定植的机会少, 生态平衡时这类菌数量少, 不会致病, 但数量超出正常水平, 就会使人体发病. 人体所携带的正常微生物群在人体消化、吸收、营养、免疫等生理活动过程中发挥着巨大的作用.

1.2 胃肠道微生态系统的生理功能

1.2.1 拮抗作用: 正常微生物群特别是肠道正常微生物群诸多的作用中, 最为重要的作用之一就是对外来的或潜在的病原菌的抑制作用, 即生物拮抗作用, 又称定植阻力. 如双歧杆菌属的细胞壁与肠黏膜上皮细胞相互作用密切结合, 与其他厌氧菌一起共同占据肠黏膜表面, 形成一道具有保护作用的生物屏障, 并通过自身及产生的代谢产物排斥致病菌, 在肠道中保持菌种优势, 并与其他菌群相互作用, 调整菌群间的关系, 以保证肠道菌群最佳组合, 并维持肠道功能的平衡[3-4].

1.2.2 免疫作用: 正常菌群促进免疫器官的发育成熟. 有报道表明, 正常菌群与肠道黏膜间具有高度适应性, 能促使肠道黏膜分泌IgA, 其分泌量是整个人体免疫系统分泌量的417倍[5]. Rigby *et al*[6]从正常小鼠的结肠组织分离出树突状细胞, 将其与长双歧杆菌细胞壁成分共培养, 结果显示长双歧杆菌能够使IL-10、IL-12的产量明显增加.

1.2.3 营养作用: 人体中的维生素K主要来自于肠道中大肠杆菌的合成, 此外肠道菌群还能合成维生素B1 、B2 、B6 、B12 、C, 叶酸, 泛酸, 核黄素等多种能够被机体利用的维生素[7]. 此外, 肠道正常菌群还能参与糖类和蛋白质代谢, 帮助肠道消化吸收. 如肠道细菌能分解蛋白质和尿素, 产生氨等物质; 结肠菌群还可使未消化吸收的外源性碳水化合物及内源性糖蛋白发酵, 产生可被结肠吸收利用的短链脂肪酸[8].

1.2.4 其他: 机体内正常的菌群还具有抗肿瘤、抗衰老的作用, 如双歧杆菌通过增强人体的免疫功能、吸收和消除致癌物的毒害、抑制突变剂的致突变等作用发挥预防和抑制肿瘤的作用[9]; 实验表明, 双歧杆菌能明显增加血液中超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量, 明显降低丙二醛(MDA)的含量, 抑制机体、组织、细胞的过氧化过程, 而起到延缓衰老的作用[10].

1.3 胃肠道微生态失调的病理表现

1.3.1 菌群失调: 是指在某一微生态环境内正常菌群中, 各菌种间的比例发生较大幅度的变化而超出正常范围的状态, 特别是原籍菌的数量和密度下降, 外籍菌和环境菌的数量和密度升高[11]. 严重的菌群失调可使宿主发生一系列临床症状, 称为菌群失调症或菌群交替症. 菌群失调可分为: Ⅰ度失调: 可逆性失调; Ⅱ度失调: 不可逆性失调; Ⅲ度失调: 亦称二重感染, 即在抗生素治疗原感染性疾病过程中造成体内菌群失调而产生的一种新的感染, 其病情凶险, 病死率高.

1.3.2 菌群易位: 指原存在于肠腔内的细菌和(或)内毒素, 通过某种途径越过肠黏膜屏障, 进入肠系膜淋巴结、门静脉系统, 继而进入体循环以及肝、脾、肺等远隔器官的过程[12]. 菌群易位的发生发展与肠道细菌过度繁殖、肠黏膜屏障损害和机体免疫防御功能低下密切相关.

■相关报道
丁维俊 *et al*观察参苓白术散对脾虚证小鼠模型肠道菌群的微生态调节作用, 结果显示, 脾虚证小鼠肠道厌氧菌群异常低下且部分需氧菌显著增加, 而参苓白术散具有扶植厌氧菌和抑制需氧菌之调整功能, 尤其是通过扶植健康因子双歧杆菌、强烈抑制主要耐药性菌株肠球菌等, 达成菌群调整.

2 中医药学与微生态学相关性的探讨

目前关于中医学与微生态学相关性的探讨有很多, 如蔡子微 *et al*[13]从学科起源、人体的结构、功能、健康状态、疾病状态、防治措施等方面对中医学与微生态学原理的统一性以及各自系统的研究特征做了比较, 结果显示了极大的统一性. 杨景云 *et al*[14]从中医学的整体观与微生态学的生物与内外环境统一论、阴阳学说与生态平衡与失调论、脏象学说与微生态系统论、调整阴阳扶正祛邪理论与微生态调节论等方面阐述古老中医药学与现代微生态学理论的相通之处. 刘卫红[15]认为微生物增殖与自溶的平

衡是机体阴平阳秘的重要内容, 自溶与增殖依其在人体微生态系统中所起的作用而表现为不同的阴阳属性, 菌种之间数量密度的变化亦有不同的阴阳属性, 如原籍菌的增殖属阳, 自溶属阴. 一旦增殖与自溶之间平衡失调, 则依菌种的不同出现阴阳偏盛偏衰的表现. 关于两者相关性的探讨多数都停留在理论层面上, 而李庆生 *et al*[16-17]采用客观指标, 以中医学中“邪正相争”较为激烈典型的肺系疾病常见病证作为临床与实验研究对象, 对中医邪正发病学说与免疫及微生态平衡相关性进行较为系统的研究, 得出研究的综合结论, 即中医学“正气”(“正胜邪退”)与微生态平衡、正常免疫物质及其功能平衡稳定有关, 主要表现为菌群多样性明显, 菌群密集度均衡, 优势菌以有益菌为主, 血清免疫球蛋白IgG, IgA, IgM维持正常水平, T淋巴细胞CD4/CD8比值正常, 血清补体C3居补体成分含量之首. 中医学“邪气”(“正虚邪盛”)与微生态失衡、免疫物质减少、免疫功能低下或紊乱有关. 主要表现为菌群多样性降低, 菌群密集度增高, 优势菌以有害菌为主, 血清免疫球蛋白IgG, IgA, IgM水平低下, T淋巴细胞CD4/CD8比值呈现倒置(0.99), 血清补体C3滴度降低.

3 中医胃肠道微生态药学研究

3.1 胃肠道微生态在中医证候研究中的应用 由于微生态学与中医药学在原理上有诸多相似之处, 越来越多的中医学者将微生态学引入到中医药研究之中, 其中一些学者将微生态学与中医证候联系起来. 如吴三明 *et al*[18]对脾虚泄泻患者进行了肠道微生态学的初步研究, 结果提示脾虚泄泻患者双歧杆菌(B)/肠杆菌(E)比值低于正常人, 认为厌氧菌减少, 尤其是B/E值改变是脾失健运患者肠道微生态学的主要特征. 卢林 *et al*[19]研究脾虚湿盛泄泻患者的肠道微生态以及舌部菌群变化, 结果显示脾虚湿盛泄泻的患者粪便中双歧杆菌比正常健康人明显减少, 并且其舌部(腻苔)的菌群构成与正常健康人(薄白苔)差异有显著性, 从而提示脾虚湿盛泄泻患者存在明显的肠道微生态失调及舌部菌群改变. 江月斐 *et al*[20]对腹泻型肠易激综合征脾胃湿热证与脾气虚证患者肠道微生态进行初步研究, 结果表明腹泻型肠易激综合征脾胃湿热证患者与脾气虚证比较, 在肠道细菌比例方面, 湿热证革兰阳性杆菌比例明显升高; 在肠道菌群密集度上, 湿热证明显高于脾气虚证; 在菌群多样性上, 湿热证与脾气虚证组无明显差异.

3.2 胃肠道微生态学在中药作用机制研究中的应用

3.2.1 中药通过胃肠道微生态系统发挥治疗作用: 中草药的给药途径主要是口服, 其代谢需要经过人体内最重要的微生态系统-胃肠道微生态系统, 那么, 中草药的取效是否与胃肠道微生态系统有关呢? 目前, 越来越多的学者开始重视微生态系统与中药作用机制之间的关系. 日本学者小桥恭一[21]研究发现大黄、番泻叶所含番泻甙, 芦荟所含芦荟甙, 口服后几乎都不被吸收, 也不被胃酸和消化酶所分解, 而是在消化道下部经肠道细菌分解酶的作用, 才产生出真正的泻下活性成分. 而且, 不同的菌种有不同的分解酶和不同的分解对象, 有的菌种有选择地分解番泻甙, 有的菌种有选择地分解芦荟甙. 动物实验发现, 由于大鼠肠道菌群与人不同, 芦荟甙通常对大鼠或无菌大鼠无效; 若使无菌大鼠单一感染人的代谢菌, 则芦荟甙会引起大鼠剧烈腹泻. 其他如甘草甙、黄芩甙、芍药甙等的研究也都有类似结果. 因此, 小桥恭一教授在1995年召开的首届国际天然药物与微生态学学术讨论会上提出, 中草药药效的发挥依赖于肠道正常微生物群的酶代谢作用. 邢德刚 *et al*[22]从调整菌群失调入手应用黄芪复方制剂(降糖素)对糖尿病大鼠进行治疗, 结果表明降糖素在调整菌群失调的同时降低血糖, 增加血清胰岛素浓度, 其可能的作用机制为降糖素可能是通过扶植正常菌群的生长发育后, 正常菌群刺激宿主建立完备的免疫系统, 刺激吞噬细胞的吞噬活性, 提高免疫蛋白含量, 增强机体免疫抗感染能力; 消除过剩的氧自由基的作用, 使组织免受损害; 抑制IDDM的免疫反应的发生, 增强胰岛细胞抗破坏能力, 恢复胰岛β细胞功能, 改善糖尿病症状.

3.2.2 中药具有调节微生态平衡的作用: 中药对微生态的调节作用主要表现在以下几个方面: (1)扶植有益菌, 抑制致病菌: 郭丽双 *et al*[23]通过实验证明神曲及其复方制剂对双歧杆菌等有益于机体的厌氧菌水平的升高具有明显促进作用, 并可以降低肠杆菌、肠球菌的数量; 丁维俊 *et al*[24]观察参苓白术散对脾虚证小鼠模型肠道菌群的微生态调节作用, 结果显示, 脾虚证小鼠肠道厌氧菌群异常低下且部分需氧菌显著增加, 而参苓白术散具有扶植厌氧菌和抑制需氧菌之调整功能, 尤其是通过扶植健康因子双歧杆菌、强烈抑制主要耐药性菌株肠球菌等, 达

■创新盘点
本文通过总结人体胃肠道微生态系统的生理病理功能, 微生态学与中医学理论的一致性及相关的临床与实验研究, 阐述了中医在胃肠道微生态领域的研究上取得的成就, 并指出了中医药微生态理论的应用前景.

■应用要点
由于微生态学与中医药学在原理上有诸多相似之处, 越来越多的中医学者将微生态学引入到中医药研究之中, 为中医药现代化的发展提供了新的契机, 也为中西医结合研究提供了新的切入点.

■同行评价
本文系统介绍了胃肠道微生态学的病理生理及其与中医理论的关系，具有一定的学术价值.

成菌群调整. 王成涛 *et al*[25]通过体外实验测定金银花、鱼腥草、青蒿、板蓝根、黄连五种清热解毒中药对乳酸菌生长及保存活力的影响，结果显示：1%和2%的金银花、青蒿对植物乳杆菌及嗜酸乳杆菌的生长和保存活性表现出明显的促进作用，鱼腥草的作用受其浓度的影响，而黄连和板蓝根对他们的生长和保存有一定抑制作用. (2)抑制细菌易位：陈晓理 *et al*[26]用脱氧胆酸胰管注射制成大鼠坏死性胰腺炎模型，观察大黄对细菌移位和胰腺继发感染的防治效果，结果显示大黄可通过促进肠道运动和黏膜分泌、刺激黏膜生长、促进炎症细胞的聚集和增生等，有效地抑制坏死性胰腺炎的细菌移位和内毒素血症，从而减少胰腺感染，显著降低大鼠胰腺炎的死亡率. (3)综合作用：很多中药通过扶植有益菌、抑制致病菌、抑制细菌易位的综合作用来调节肠道菌群，发挥治疗作用. 如陈海龙 *et al*[27]观察大承气汤对MODS时肠道细菌微生态学影响，结果发现：通里攻下中药能显著减少肠道内GNB的数量，显著提高双歧杆菌和乳酸杆菌的数量，增加机体对外来细菌的定植抗力；降低肠腔游离内毒素含量，从而降低门静脉和周围静脉中内毒素含量；降低细菌易位发生率，减少氧自由基产生，减轻过氧化损伤，保护肠道屏障功能，控制MODS的发生发展并改善预后.

4 结论

现代微生态学的兴起使中医与现代医学有了新的结合点，其原理上与中医基础理论的一致性使其成为中西医结合研究的新的切入点，为中医药现代化的发展提供了新的契机. 近年来，经过众多中医药学者的不懈钻研，中医药微生态学这一新的理论体系已初步形成，但仍需进一步认识和整理研究中医学所包涵的微生态内容，加强中医药微生态理论与应用的研究，尤其要进一步发挥微生态理论在中药药理研究中的指导作用，充分利用现代微生态学的原理与技术，拓展中医药在微生态领域的研究，使中医药理论和疗效进一步为世界所认同.

5 参考文献

1 Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-519
2 王瑞君. 人体的胃肠道微生态系统和微生态失衡. 渝西学院学报(自然科学版) 2005; 4: 39-41
3 Fernandez MF, Boris S, Barbes C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 449-455
4 Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *J Appl Microbiol* 2003; 94: 403-412
5 Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004; 303: 1662-1665
6 Rigby RJ, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Production of interleukin (IL)-10 and IL-12 by murine colonic dendritic cells in response to microbial stimuli. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 245-256
7 尹军霞, 林德荣. 肠道菌群与疾病. 生物学通报 2004; 39: 26
8 Besselink MG, Timmerman HM, Buskens E, Nieuwenhuijs VB, Akkermans LM, Gooszen HG. Probiotic prophylaxis in patients with predicted severe acute pancreatitis (PROPATRIA): design and rationale of a double-blind, placebo-controlled randomised multicenter trial [ISRCTN38327949]. *BMC Surg* 2004; 4: 12
9 齐占朋, 杨宏艳, 王玉春. 双歧杆菌的保健作用. 齐齐哈尔医学院学报 2007; 28: 185-187
10 王挺, 李戈. 双歧杆菌对D-半乳糖致衰老小鼠的抗衰老作用. 中国老年学杂志 2007; 27: 47-48
11 陶方明. 人体的微生态平衡. 检验医学与临床 2007; 4: 204-205
12 肖菲, 康焰. 肠道细菌移位的研究现状. 中国普外基础与临床杂志 2006; 13: 240-243
13 蔡子微, 康白. 关于中医学与微生态学在原理上的统一性. 中国微生态学杂志 1995; 7: 43-48
14 杨景云, 杨继新. 中医药微生态学的研究现状. 中国微生态学杂志 2003; 11: 1-3
15 刘卫红. 微生物自溶现象在中医微生态学研究中的意义. 山东中医药大学学报 1998; 5: 328
16 李庆生, 袁嘉丽, 陈文慧. 微生态失调与免疫功能紊乱属中医学“邪气”范畴. 中医药学刊 2005; 23: 199-202
17 李庆生, 袁嘉丽, 陈文慧. 中医学“正气”应包括微生态与免疫平衡. 云南中医学院学报 2005; 28: 1-7
18 吴三明, 张万岱. 脾虚泄泻患者肠道微生态学的初步研究. 中国中西医结合脾胃杂志 1996; 4: 203
19 卢林, 杨景云, 李丹红. 脾虚湿盛泄泻患者肠道微生态及舌部菌群变化的临床观察. 中国微生态学杂志 2007; 19: 333-334
20 江月斐, 劳绍贤, 邝枣园, 傅肖岩, 卞兆祥. 腹泻型肠易激综合征脾胃湿热证与脾气虚证肠道微生态初步研究. 福建中医学院学报 2005; 2: 1-3
21 小桥恭一. 中药有效成分与肠道细菌的关系. 医学与哲学 1995; 11: 598
22 邢德刚, 高艳华, 张桂芳, 马淑霞, 杨景云. 从调整肠道菌群研究黄芪复方制剂对糖尿病大鼠的治疗机制. 中国微生态学杂志 2000; 6: 335-337
23 郭丽双, 杨旭东, 胡静, 蔡子微, 杨景云. 中药“神曲”对肠道菌群失调小鼠调整和保护作用的观察. 中国微生态学杂志 2005; 3: 174-176
24 丁维俊, 周邦靖, 翟慕东. 参苓白术散对小鼠脾虚模型肠道菌群的影响. 北京中医药大学学报 2006; 8: 530-533
25 王成涛, 籍保平, 朱桂华, 刘天兵. 五味中草药对乳酸菌生长及保存活力的影响. 中国微生态学杂志 2004; 2: 75-76
26 陈晓理, 吴言涛, 冯凯祥. 抑制细菌移位是大黄治疗急性胰腺炎的主要作用机制. 中国中西医结合杂志 2000; 7: 46-47
27 陈海龙, 吴咸中, 关凤林. 大承气汤对MODS时肠道细菌微生态学影响的实验研究. 中国微生态学杂志 2007; 2: 132-134

编辑 李军亮 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3139-3145
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

启膈散及其拆方对人食管癌Eca109细胞裸鼠移植瘤血管生成的抑制作用

司富春

司富春, 河南中医学院中医药分子生物学实验室 河南省郑州市 450008
司富春, 1994年上海中医药大学博士, 1995-1998年韩国浦项科技大学博士后, 河南省特聘教授, 主要从事肿瘤中医方证研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30171160, No. 30371716
通讯作者: 司富春, 450008, 河南省郑州市金水路1号, 河南中医学院中医药分子生物学实验室. sifc2000@hotmail.com
电话: 0371-65680049 传真: 0371-65962406
收稿日期: 2008-06-19 修回日期: 2008-09-10
接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-08

Inhibitory effect of *Qigesan* and its separated formula on angiogenesis of esophageal carcinoma Eca109 cell-transplanted nude mouse tumor

Fu-Chun Si

Fu-Chun Si, Laboratory of Molecular Biology for Traditional Chinese Medicine, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, Henan Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30171160, No. 30371716
Correspondence to: Fu-Chun Si, Laboratory of Molecular Biology for Traditional Chinese Medicine, Henan College of Chinese Traditional Medicine, Zhengzhou 450008, Henan Province, China. sifc2000@hotmail.com
Received: 2008-06-19 Revised: 2008-09-10
Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To explore the effects and mechanism of *Qigesan* and its separated formula on tumor angiogenesis.

METHODS: Exponentially growing Eca109 human esophageal carcinoma cells (1×10^6 cells/mouse) were injected subcutaneously into the flank of 6- week-old female BALB/c nude mice. On the next day after inoculation, the decoctions (40 folds of adult dosage) of *Qigesan* (W) and its separated formula (blood-activating group P and resolving phlegm group R) were administered by oral gavage once a day for 60 days. Microvessel density (MVD) and VEGF expression in the transplanted tumor was detected using immunohistochemtry, and the protein expressions of EGFR, PDGFR, VEGF and phospholipase C-γ1 (PLC-γ1) were determined using Western blot.

RESULTS: Microvessel density (MVD) in the transplanted tumor of all treatment groups were markedly decreased compared with that in control group (36.43 ± 4.16, 40.29 ± 2.87 42.43 ± 3.04 vessels/mm^2 *vs* 48.57 ± 7.45 vessels/mm^2, P < 0.05 or 0.01) MVD and VEGF had statistically positive correlation by SPASS13.0 (r = 0.712, P = 0.0005). The protein expressions of EGFR, PDGFR, VEGF and phospholipase C-γ1 (PLC-γ1) were obviously decreased compared with that in control group. Inhibitory effects of *Qigesan* and its separated formula on MVD and those protein expressions were the best in group W and second in group P.

CONCLUSION: *Qigesan* and its separated formula can inhibit tumor angiogenesis, which is related to the inhibition of protein expressions of EGFR, PDGFR, VEGF and PLC-γ1.

Key Words: *Qigesan* prescription; Esophageal carcinoma cells; Tumor transplanted nude mice; Tumor angiogenesis; Epidermal growth factor receptor; Platelet-derived growth factor receptor; Vascular endothelial growth factor; Phospholipase C-γ1

Si FC. Inhibitory effect of *Qigesan* and its separated formula on angiogenesis of esophageal carcinoma Eca109 cell-transplanted nude mouse tumor. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3139-3145

摘要

目的: 探讨启膈散及其拆方抑制肿瘤血管生成的作用和机制.

方法: 取对数生长期的人食管癌EC9706细胞, 接种于裸鼠右胁皮下制备荷瘤裸鼠模型. 自接种后第2天开始, 每天用40倍成人剂量的启膈散全方及其活血和化痰两个拆方水煎液灌胃给药, 连续60 d. 用免疫组化方法检测移植瘤中Fac-Ⅷ因子相关抗原标记的微血管密度

■背景资料
1971年Folkman提出了癌症发育过程中血管形成假说, 从而开创了癌症发生机制和治疗研究的新领域. 30多年来对肿瘤血管形成在肿瘤发生中的作用和抗血管形成药物进行了大量研究, 发现了血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(BFGF)等多种促血管形成因子, 2004年两种抗血管内皮药物Avastin和Lucentis在美国上市, 至今抗肿瘤血管形成仍是肿瘤治疗研究的焦点. 启膈散是清代名医程钟龄在他的《医学心悟》中为治疗噎膈病所创制的方剂, 以往研究发现该方具有抑制食管癌细胞和肿瘤生长的作用, 临床上治疗食管癌有肯定疗效.

■同行评议者
唐志鹏, 研究员, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科

■研发前沿
针对肿瘤血管形成的关键分子机制是目前肿瘤药物研发的焦点之一.

(MVD)和VEGF的表达, Western blot方法检测肿瘤组织EGFR、PDGFR、VEGF及PLC-γ1蛋白表达.

结果: 各用药组肿瘤MVD与模型组相比明显降低(36.43±4.16, 40.29±2.87 42.43±3.04 vessels/mm^2 *vs* 48.57±7.45 vessels/mm^2, P<0.05或0.01). 各组肿瘤MVD值与VEGF表达量呈正相关(r = 0.712, P = 0.0005). 各用药组肿瘤EGFR、PDGFR、VEGF、PLC-γ1蛋白表达与模型组相比明显降低. 启膈散及其拆方抑制裸鼠移植瘤MVD及EGFR、PDGFR、VEGF、PLC-γ1蛋白表达的作用以全方组最好, 活血组次之.

结论: 启膈散及其拆方能够抑制肿瘤血管生成, 其作用机制与抑制EGFR、PDGFR、VEGF及PLC-γ1蛋白表达相关.

关键词: 启膈散; 食管癌细胞; 荷瘤裸鼠; 肿瘤血管生成; 表皮生长因子受体; 血小板衍生生长因子受体; 血管内皮生长因子; 磷脂酶C-γ1

司富春. 启膈散及其拆方对人食管癌Eca109细胞裸鼠移植瘤血管生成的抑制作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3139-3145
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3139.asp

0 引言

肿瘤的生长促使依赖血管生成, 肿瘤的生长依赖血管供应的氧和营养物质的支持, 同时血管内皮细胞分泌多种生长因子促进肿瘤细胞增殖, 肿瘤血管生成是肿瘤转移的重要环节. 因此, 抑制肿瘤血管生成已成为治疗肿瘤的重要策略. 我们以往研究发现, 启膈散及其拆方明显抑制食管癌体外培养细胞和裸鼠移植瘤生长[1-2], 为了进一步研究其作用机制, 本研究观察了该方对食管癌Eca109细胞裸鼠移植瘤微血管密度及EGFR、PDGFR、VEGF、PLC-γ1蛋白表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 丹参、郁金、砂仁壳、北沙参、贝母、茯苓购于河南中医学院第三附属医院, 经鉴定皆为正品. 分为全方组(W组, 方含丹参、郁金、砂仁壳、北沙参、贝母、茯苓)、活血行气组, 简称活血组(P组, 方含丹参、郁金、砂仁壳)、润燥化痰组, 简称化痰组(R组, 方含北沙参、贝母、茯苓), 每味药各10 g, 煎煮、浓缩、5000 *g*离心、0.22 μm过滤, 取部分干燥称重, 换算出浓度, 用时调至所需浓度. 人食管癌细胞株Eca109从郑州大学医学院组胚教研室引进. BALB/C(nu/nu)♀裸鼠, 6周龄, 购自中国科学院上海实验动物中心/上海斯莱克实验动物有限公司. DMEM培养基和多聚甲醛(Gibco公司)、PMSF与Leupeptin (Amresco公司), 丙烯酰胺(Biomol公司)、胰蛋白酶、山羊抗小鼠IgG-HRP和山羊抗兔IgG-HRP(华美公司)、 ECL试剂盒(Santa Cruz公司)、PLC-γ1 mAb(韩国浦项科技大学国家信号传导网络实验室惠赠)、鼠抗人EGFR mAb、兔抗人PDGFRβ多克隆抗体和兔抗人VEGF多克隆抗体(Santa Cruz公司)、兔抗人八因子(FactorⅧ related antigen, Fac-Ⅷ)相关抗原多克隆抗体(北京中杉公司), 山羊抗兔SABC免疫组化试剂盒(博士德公司), 考马斯亮蓝G250(Amresco公司). Heraeus细胞培养箱(德国Kendro公司产品)、倒置显微镜(德国ZEISS公司产品)、SG-603生物安全柜(Bake公司产品)、BCM-1000A型生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)、紫外分光光度计(Thermo公司)、蛋白电泳系统(BIO-RAD公司)、台式冷冻离心机(Sigma公司)、切片机(Zeiss公司)、Olympus显微镜、游标卡尺(上海量具刀刃厂产品)、BIO2000医学图像分析系统.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 生长于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中, 置于37℃、50 mL/L CO_2培养箱, 每间隔48 h更换一次培养基, 待细胞生长至70%汇合率时, 用胰蛋白酶溶液[用D-Hans液配制, 含2.5 g/L胰蛋白酶, 0.2 g/L乙二胺四乙酸二钠(EDTA), pH8.3]消化, 用于裸鼠移植瘤接种.

1.2.2 裸鼠饲养: 裸鼠饲养于生物安全柜内, 饲养房间每周2次紫外线照射, 出入人员更换洁净工作衣. 裸鼠食物、垫料进行湿热消毒后烘干使用, 饮用水加入盐酸使pH稳定在3-4之间, 定期喂养消毒后的黄豆. 一切严格无菌操作.

1.2.3 Eca109细胞裸鼠移植瘤模型建立: 收集对数期生长细胞, 1000 r/min离心, 无血清DMEM培养基洗涤2次, 细胞计数, 用不含血清的DMEM培养基调细胞浓度至5×10^6 个/mL, 以0.2 mL/鼠右胁皮下接种. 50只裸鼠随机取10只为空白组, 其余40只造模. 造模裸鼠随机分为对照组C、W组、P组、R组共4组, 每组10只. 所有处理自造模后第2天开始, 均采用人常用量的40倍ig, 每日1次, 每只0.2 mL. 自肿瘤长出之日起, 每10 d称体质量, 测量肿瘤大小, 以上处理连续

进行60 d后, 脱颈椎处死裸鼠, 剥离瘤块, 称取肿瘤重量和计算药物抑瘤率[2].

1.2.4 病理观察: HE染色进行肿瘤病理组织学观察.

1.2.5 VEGF蛋白表达检测: 免疫组化法(SABC法)检测VEGF蛋白表达. 按试剂盒说明操作. 兔抗人VEGF多克隆抗体浓度1∶200, PBS代替一抗作为阴性对照.应用BI2000医学图像分析系统进行分析, 在显微镜×200视野下, 每个切片随机在4个视野, 取分布密度值.

1.2.6 Fac-Ⅷ因子相关抗原抗体标记的肿瘤微血管密度MVD值的测定: 按试剂盒说明操作. 兔抗人F-Ⅷ因子相关抗原抗体浓度1∶50, PBS代替一抗作为阴性对照, 任何被染成棕黄或棕褐色的、分界清楚的内皮细胞或内皮细胞团簇, 均作为一个血管计数. 低倍视野×40或×100下选择3个微血管新生活跃区, ×200视野下(0.739 mm^2/视野)分别计数F-Ⅷ因子相关抗原抗体标记的微血管数, 取其平均值, 计算MVD值(vessels/mm^2), 反映新血管生成活跃度.

1.2.7 Western blot法检测瘤体组织EGFR、PLC-γ1、PDGFRβ、VEGF蛋白表达: 取裸鼠肿瘤组织0.5 g, 用细胞裂解液裂解(裂解液组成: 20 mmol/L HEPES, pH7.2, 100 mL/L甘油, 50 mmol/L NaCl, 10 mL/L TritonX-100, 1 mmol/L Na_3VO_4, 10 mg/L Leupeptin和1 mmol/L PMSF), 用80 g/L SDS-PAGE电泳, 分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜, 50 g/L脱脂奶粉TTBS溶液封闭滤膜1 h(TTBS: 10 mmol/L Tris, pH7.6, 150 mmol/L MNaCl, 0.5 mL/L Tween 20), 每张膜用所要检测蛋白相应抗体反应, EGFR、PDGFRβ和VEGF抗体用50 g/L脱脂奶粉TTBS溶液稀释浓度为0.4 mg/L, PLC-γ1抗体稀释浓度为1 mg/L, 再用相应的羊抗鼠或羊抗兔IgG-HRP(1∶50)检测和ECL底物显影.

统计学处理 计量数据应用软件SPSS13.0 进行单因素方差分析和Spearman相关分析(α = 0.05).

2 结果

2.1 病理观察 肿瘤组织为典型的鳞状上皮癌. 模型组肿瘤细胞呈片状或巢状分布, 胞质丰富呈嗜碱性, 可见病理核分裂像, 角化珠消失, 内有散在毛细血管, 间质相对较少; 全方组肿瘤细胞出现萎缩现象, 病理核分裂像明显减少, 角化珠增多体积增大, 间质明显增多, 纤维细胞明显增多; 活血组肿瘤细胞出现萎缩现象, 病理核分裂像明显减少, 肿瘤细胞凋亡增多, 角化珠增多体积缩小, 间质明显增多, 纤维细胞明显增多; 化痰组肿瘤细胞出现一定的萎缩, 病理核分裂像明显减少, 角化珠明显减少或消失, 间质明显减少并纤维细胞明显减少(图1).

表 1 各组肿瘤MVD、VEGF蛋白表达

分组	*n*	血管密度 (vessels/mm^2)	VEGF蛋白表达 (密度值)
C	8	48.57 ± 7.45	0.316 ± 0.110
W	7	36.43 ± 4.16[b]	0.198 ± 0.075[d]
P	7	40.29 ± 2.87[f]	0.210 ± 0.053
R	7	42.43 ± 3.04[h]	0.217 ± 0.073

[b]P<0.0005, [d]P<0.039, [f]P<0.021, [h]P<0.004 *vs* C组.

2.2 VEGF蛋白表达和肿瘤MVD 各组肿瘤微血管密度, 经单因素方差分析, 模型组C和W、P比较具有统计学意义(P = 0.0005, 0.021), W和R比较P = 0.004, 说明启膈散及其拆方可以抑制微血管的生成, 以全方组最好、活血组次之(表1, 图2). VEGF在肿瘤组织中的表达, 呈棕黄色颗粒状或弥漫性分布, 肿瘤细胞、间质、血管都有表达. 癌巢周边的癌细胞表达呈强阳性, 近角化珠的癌细胞表达呈弱阳性, 微血管上皮表达呈强阳性. W组、P组、R组VEGF表达呈弱阳性(图3); 模型组C和W、P、R相比, P值分别为0.039、0.081和0.118. MVD和VEGF两者作Spearman等级相关分析, 相关系数r = 0.712, P = 0.0005. 说明启膈散及其拆方抑制微血管的生成与抑制VEGF表达有相关性.

2.3 启膈散及其拆方对Eca109细胞裸鼠肿瘤组织EGFR、PDGFR、VEGF、PLC-γ1蛋白表达的抑制作用 Western blot检测结果显示, 用启膈散及其拆方治疗的裸鼠肿瘤组织内EGFR、PDGFR、VEGF、PLC-γ1蛋白表达与对照组相比明显减弱, 说明启膈散及其拆方对这些蛋白表达具有很强的抑制作用, 其中全方组作用最强, 活血组次之(图4).

3 讨论

肿瘤血管的生成促使肿瘤的生长. 肿瘤大于1-2 mm^3时, 肿瘤生长依赖于血管供应的氧和养料, 同时, 血管内皮细胞还可分泌多种生长因子促进肿瘤细胞增殖. 肿瘤血管生成还是肿瘤转移的重要环节, 发育不良的肿瘤血管和新生的血管内皮细胞分泌的多种蛋白酶都易使肿瘤细胞

■**相关报道**
PLC-γ1是EGF、PDGF、VEGF、FGF、TGFβ等生长因子共同的细胞内效应分子, PLC-γ1介导的信号传导调节细胞增殖和分化, 参与肿瘤血管生成.

■**创新盘点**
本文首次报道了启膈散及其拆方通过抑制生长因子-PLC-γ1信号传导抑制肿瘤血管生成.

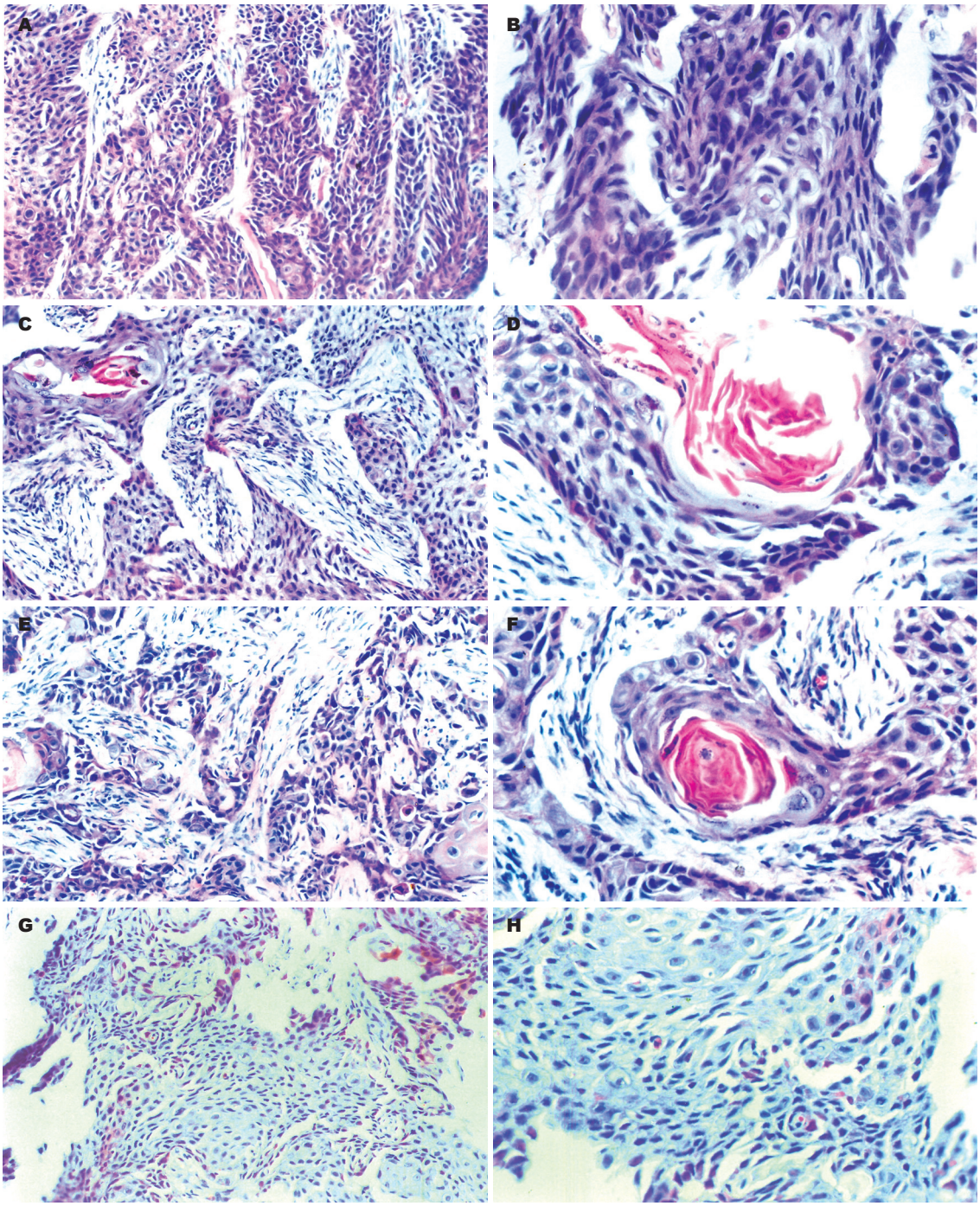


图 1 病理组织学观察(HE染色). A: 模型组×200; B: 模型组×400; C: 全方组×200; D: 全方组×400; E: 活化组×200; F: 活化组×400; G: 化痰组×200; H: 化痰组×400.

进入血流发生转移[3]. 因此, 抑制肿瘤血管生成, 已成为治疗肿瘤的重要策略[4-6]. MVD是研究肿瘤血管的重要测定指标[7]. 在食管癌中, 随着肿瘤组织中MVD值的增高, 患者的生存时间明显缩短, 生存率显著下降, 多因素预后分析表明, MVD值可作为食管鳞状细胞癌患者的预后判断指标[8-9]. 我们以前报道启膈散全方及其活血组拆方对裸鼠食管癌肿瘤生长抑制作用有很大差异, 在移植瘤生长前20 d, 活血组作用强于全方组, 与体外实验一致, 在移植瘤生长20 d后瘤体大于2 mm^3, 全方组效果好于活血组, 推测肿瘤微环境中血管生成对启膈散及其拆方作用有很大影响[2]. 本研究对移植瘤病理组织学检测显示模型组胞质丰富呈嗜碱性, 角化珠消失, 间质较少, 各用药组肿瘤细胞出现不同程度萎缩, 胞浆减少, 嗜碱性改变减轻, 角化珠增多, 体积增大, 间质增宽, 表明所建立的食管癌移植瘤模型细胞代谢增强, 启膈散及其拆方对其有明显的

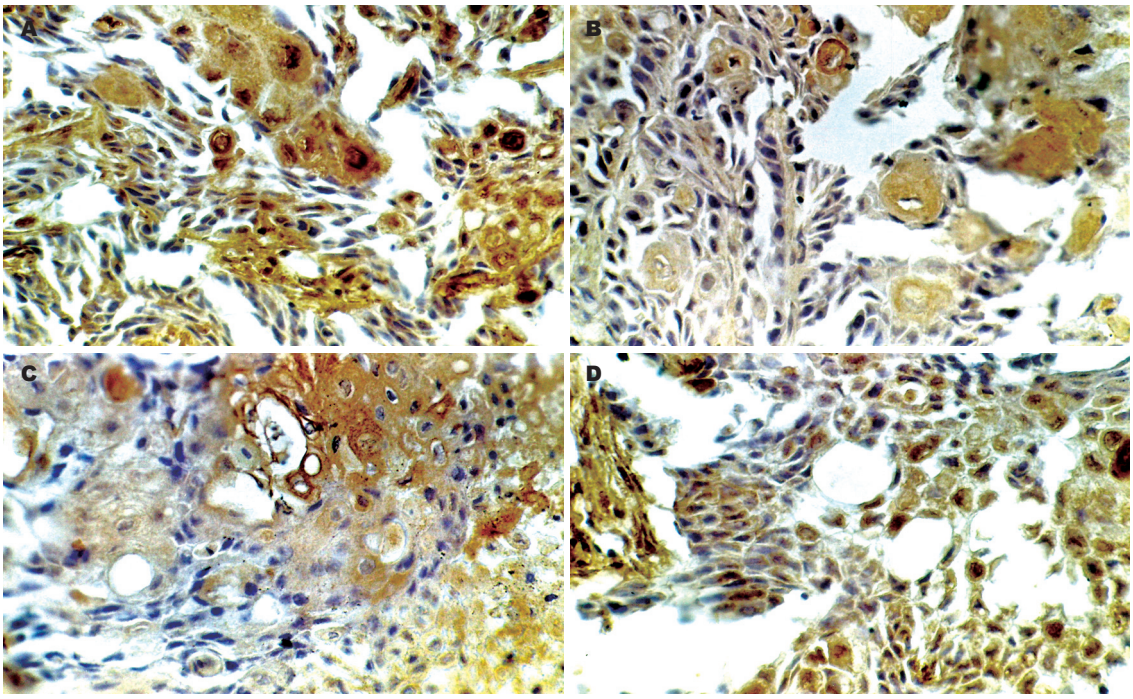


图 2 F-Ⅷ因子相关抗原抗体标记的微血管密度(SABC免疫组化法×400). A: 模型组; B: 全方组; C: 活血组; D: 化痰组.

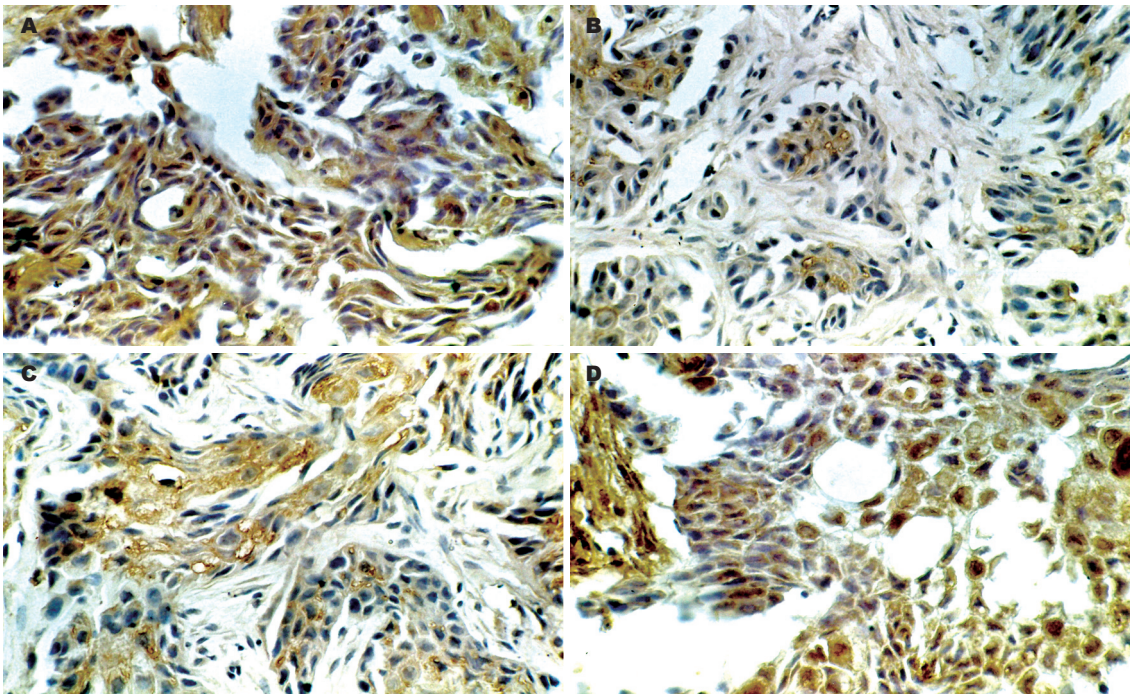


图 3 VEGF表达(SABC免疫组化法×400). A: 模型组; B: 全方组; C: 活血组; D: 化痰组.

■应用要点
本文为启膈散治疗食管癌的临床应用和进一步药物研发提供实验依据.

抑制作用. 免疫组化结果进一步表明模型组移植瘤组织中毛细血管增生活跃, MVD为48.57±7.45 vessels/mm^2, 启膈散及其拆方可以不同程度减少MVD, 说明该方可以抑制微血管的生成, 以全方组效果最好, 活血组次之.

肿瘤细胞和肿瘤微环境中的其他细胞可以分泌很多促进血管生成的因子, 如EGF、PDGF、VEGF、FGF、TGFβ等. 而这些生长因子信号有一个共同的细胞内效应分子PLC-γ1, 研究表明PLC-γ1介导的信号传导参与了血管生成[10]. VEGF在大、小血管内皮细胞有均高亲合结合位点, 在生理性血管生成和肿瘤血管生成中都起着极其重要的作用[11-12]. 他一方面可以增加血管通透性, 有利于血浆蛋白、纤维蛋

■名词解释
肿瘤微血管形成：是癌细胞获得血管生长能力，分泌血管生长因子，诱导毛细血管形成而建立血液循环的过程. 肿瘤血管生成机制及抗血管生成治疗肿瘤研究是当前肿瘤研究的热点.

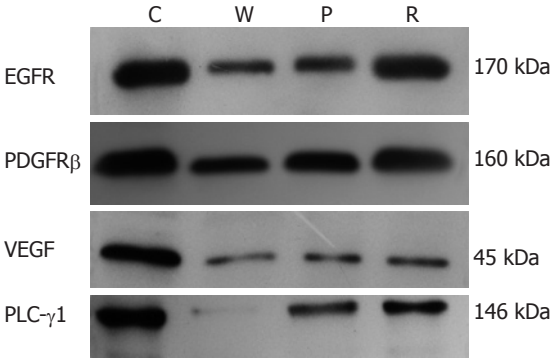


图 4 启膈散及其拆方对Eca109细胞裸鼠肿瘤组织PLC-γ1、PDGFR、EGFR、VEGF蛋白表达的影响. C: 模型组; W: 全方组; P: 活血组; R: 化痰组.

白原外渗, 促进血管生成和新基质形成; 另一方面, 通过其受体促进血管内皮细胞增殖、迁移. VEGF在食管鳞癌和腺癌中都有表达[8,13-14], 本实验结果表明, VEGF在Eca109细胞裸鼠移植瘤组织中具有很强表达, 分布于肿瘤细胞胞质、血管上皮细胞及间质中, 启膈散及其拆方可以不同程度的抑制VEGF的表达, 并与MVD具有相关性, Western blot分析也证明了这一点, 说明启膈散及其拆方抑制VEGF表达是其抑制肿瘤血管生成的途径之一.

血小板衍生生长因子受体(platelet-derived growth factor receptorα/β, PDGFR)是一个酪氨酸激酶受体, 参与各种各样生理活动[15], PDGFR异常在肿瘤发生、生长和转移中起关键作用[16-17]. PDGF可以自分泌和旁分泌的形式与其受体结合刺激肿瘤细胞和基质细胞增殖或活化, 募集肿瘤成纤维细胞, 同时参与肿瘤血管的生成[18-19]. 已发现PDGF在食管癌肿瘤细胞中以自分泌形式刺激细胞的生长和生存[20]. 本研究发现Eca109细胞裸鼠移植瘤组织中表达PDGFR蛋白, 启膈散及其拆方可以不同程度的抑制PDGFR的表达, 以全方组最好, 说明PDGFR参与移植肿瘤组织生长, 也可能参与移植肿瘤的血管生成, 抑制PDGFR表达是启膈散及其拆方抑制肿瘤生长的重要途径.

EGFR不但参与肿瘤细胞的增殖、分化和抗凋亡, 同时还参与血管的生成, 与肿瘤生长和转移具有密切关系[21-23]. EGFR在多种肿瘤组织的血管内皮细胞中表达, 通过促进VEGF、IL-8、FGF的表达间接促进肿瘤血管生成[24]. EGFR在食管癌细胞中高度表达, 表达及活性的强度与食管癌的恶性程度、耐药性及发展和预后相关[25-27]. 在体外实验中已表明启膈散及其拆方可以不同程度的抑制Eca109细胞EGFR表达[1], 本实验也显示了类似的结果, 不过全方组优于活血组. 进一步说明下调EGFR是启膈散及其拆方治疗肿瘤的重要机制.

磷脂酶Cγ1(phospholipase C-γ1, PLC-γ1)是EGF、VEGF、PDGF等多种细胞生长因子信号传导的细胞内效应分子, 在细胞信号转导中起关键作用[28-29], 其超量表达和激活引起肿瘤发生、浸润和转移[30-32]. 我们以往的研究发现PLC-γ1在食管癌组织中超量表达, 体外实验证明启膈散及其拆方可以抑制Eca109细胞PLC-γ1介导的信号传导[1]; 本次体内实验表明启膈散及其拆方不但可以抑制Eca109细胞裸鼠移植瘤组织中PLC-γ1蛋白表达而抑制肿瘤生长, 而且通过抑制PLC-γ1介导的信号传导起到抑制生长因子引起的肿瘤血管生成作用.

总之, 启膈散及其拆方可以不同程度地抑制Eca109细胞裸鼠移植瘤生长、肿瘤血管生成和VEGF、EGFR、PDGFRβ、PLC-γ1蛋白表达, 其作用以全方组最好, 活血组次之. 血管生成是肿瘤生长的重要条件, VEGF、EGF、PDGF可以促进血管生成, PLC-γ1是这些生长因子信号的细胞内效应分子, 因此, 启膈散及其拆方通过抑制生长因子-PLC-γ1信号传导直接抑制肿瘤细胞的生长, 又可以通过此途径抑制肿瘤血管生成, 间接地抑制肿瘤细胞的增殖和肿瘤生长.

4 参考文献

1 司富春. 陈玉龙. 启膈散及其拆方对食管癌细胞Eca109 PLC-γ1介导的细胞信号转导的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2583-2588
2 司富春. 启膈散及其拆方抑制人食管癌细胞裸鼠移植瘤作用的机理研究. 中国中医基础医学杂志 2007; 13: 451-453
3 Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2039-2049
4 Couzin J. Microbiology. Weight of the world on microbes' shoulders. *Science* 2002; 295: 1444-1445
5 Shojaei F, Ferrara N. Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Cancer J* 2007; 13: 345-348
6 Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005; 438: 967-974
7 Rmali KA, Puntis MC, Jiang WG. Tumour-associated angiogenesis in human colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007; 9: 3-14
8 Du JR, Jiang Y, Zhang YM, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1604-1606
9 Xu W, Zhang L, Xie Y. [Expression of vascular endothelial growth factor in primary esophageal squamous cell carcinoma and its significance in angiogenesis and prognosis of the tumor] *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001; 81: 860-862
10 Singh AJ, Meyer RD, Navruzbekov G, Shelke R,

Duan L, Band H, Leeman SE, Rahimi N. A critical role for the E3-ligase activity of c-Cbl in VEGFR-2-mediated PLCgamma1 activation and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 5413-5418
11 Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem* 2007; 102: 1358-1367
12 Roskoski R Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62: 179-213
13 Möbius C, Freire J, Becker I, Feith M, Brücher BL, Hennig M, Siewert JR, Stein HJ. VEGF-C expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus. *World J Surg* 2007; 31: 1768-1772; discussion 1773-1774
14 Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2004; 87: 95-104
15 Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev* 2008; 22: 1276-1312
16 Yu J, Ustach C, Kim HR. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: 49-59
17 Betsholtz C. Biology of platelet-derived growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003; 69: 272-285
18 Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 1241-1257
19 Shih AH, Holland EC. Platelet-derived growth factor (PDGF) and glial tumorigenesis. *Cancer Lett* 2006; 232: 139-147
20 Liu YC, Chen SC, Chang C, Leu CM, Hu CP. Platelet-derived growth factor is an autocrine stimulator for the growth and survival of human esophageal carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 1996; 228: 206-211
21 De Luca A, Carotenuto A, Rachiglio A, Gallo M, Maiello MR, Aldinucci D, Pinto A, Normanno N. The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment. *J Cell Physiol* 2008; 214: 559-567
22 Lui VW, Grandis JR. EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer Res* 2002; 22: 1-11
23 Ciardiello F. Epidermal growth factor receptor inhibitors in cancer treatment. *Future Oncol* 2005; 1: 221-234
24 Ellis LM. Epidermal growth factor receptor in tumor angiogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004; 18: 1007-1021, viii
25 Pande AU, Iyer RV, Rani A, Maddipatla S, Yang GY, Nwogu CE, Black JD, Levea CM, Javle MM. Epidermal growth factor receptor-directed therapy in esophageal cancer. *Oncology* 2007; 73: 281-289
26 Wang KL, Wu TT, Choi IS, Wang H, Reseetkova E, Correa AM, Hofstetter WL, Swisher SG, Ajani JA, Rashid A, Albarracin CT. Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer* 2007; 109: 658-667
27 Wilkinson NW, Black JD, Roukhadze E, Driscoll D, Smiley S, Hoshi H, Geradts J, Javle M, Brattain M. Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 448-453
28 Meisenhelder J, Suh PG, Rhee SG, Hunter T. Phospholipase C-gamma is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases in vivo and in vitro. *Cell* 1989; 57: 1109-1122
29 McLaughlin AP, De Vries GW. Role of PLCgamma and Ca(2+) in VEGF- and FGF-induced choroidal endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C1448-C1456
30 Wells A, Grandis JR. Phospholipase C-gamma1 in tumor progression. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 285-290
31 Choi JH, Ryu SH, Suh PG. On/off-regulation of phospholipase C-gamma 1-mediated signal transduction. *Adv Enzyme Regul* 2007; 47: 104-116
32 司富春. 启膈散及其拆方抑制原代培养食管癌细胞PLC-γ1介导的信号转导的作用. 国际中医中药杂志 2007; 29: 3-10

■同行评价
本文选题较好, 设计合理, 结果可靠, 结论可信, 具有一定的理论指导价值.

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 •

世界华人消化杂志栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3146-3151
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

大鼠Smad7真核表达质粒的构建及在肝星状细胞中的表达

杨小艳, 杨 勇, 郑 勇, 李 睿, 周 婷, 孙 侃, 常向云, 陈卫刚

■背景资料
肝纤维化是细胞外基质(ECM)在肝脏过多沉积的结果, 其关键环节是肝星状细胞(HSC)的激活, HSC体外培养自行活化, 模拟了体内纤维化过程, 是很好的肝纤维化模型. 转化生长因子β(TGF-β)是肝纤维化形成中最重要的细胞因子, 其信号传入依赖Smad完成, Smad7是TGF-β信号转导途径的主要抑制性蛋白, 具有抗纤维化的作用.

杨小艳, 新疆石河子大学医学院第一附属医院老干一科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008
杨勇, 新疆石河子大学医学院第一附属医院心内二科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008
郑勇, 李睿, 孙侃, 常向云, 陈卫刚, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008
周婷, 新疆石河子大学医学院第一附属医院中心实验室 新疆维吾尔自治区石河子市 832008
杨小艳, 医学硕士, 主要从事肝纤维化基因干预治疗的研究.
教育部科学技术研究重点资助项目, No. 207136
兵团博士基金资助项目, No. 05JC08
通讯作者: 郑勇, 832008, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆石河子大学医学院第一附属医院消化内科. selia623@sina.com
电话: 0993-2859284
收稿日期: 2008-05-02 修回日期: 2008-09-20
接受日期: 2008-09-22 在线出版日期: 2008-10-08

Construction of eukaryotic expression vector for rat Smad7 and its expression in hepatic stellate cell line HSC-T6

Xiao-Yan Yang, Yong Yang, Yong Zheng, Rui Li, Ting Zhou, Kan Sun, Xiang-Yun Chang, Wei-Gang Chen

Xiao-Yan Yang, the First Cadre Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Yong Yang, the Second Cadre Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Yong Zheng, Rui Li, Ting Zhou, Kan Sun, Xiang-Yun Chang, Wei-Gang Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Ting Zhou, Center Laboratory, the First Affiliated Hospital of Shihezi University Medical College, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Supported by: the Ministry of Education Science and Technology Research Key Project, No. 207136; and the Crops Foundation for the Doctor, No. 05JC08
Correspondence to: Dr. Yong Zheng, Department of Gastroenterology, the First Attiliated Hospital of Shihezi University Medical College, Shihezi 832008, Xinjiang UygurAutonomous Region, China. selia623@sina.com
Received: 2008-05-02 Revised: 2008-09-20
Accepted: 2008-09-22 Published online: 2008-10-08

■同行评议者
周士胜, 教授, 大连大学医学院医学研究中心

Abstract

AIM: To construct rat Smad7 eukaryotic vector, observe whether the extraneous Smad7 gene can transfect HSC-T6 effectively as an anti-fibrosis factor, and to investigate its effect on expression of TGF-β1, collagen Ⅰ and collagen Ⅲ mRNA in rat HSC-T6 cells.

METHODS: Rat Smad7 cDNA was cloned into eukaryotic plasmid pcDNA3.1(+) to construct Smad7/pcDNA3.1(+) plasmid and transfect it into HSC-T6 cells by Lipofectmine2000. The positive clone was selected by G418. The expression level of Smad7 protein was detected using Western blot, and the levels of Smad7, TGF-β1, collagen Ⅰ and Ⅲ mRNA by RT-PCR were further detected using RT-PCR, respectively.

RESULTS: Smad7 eukaryotic vector was successfully constructed and confirmed by endonuilease digestion and sequencing. And Smad7 mRNA and protein expression was significantly higher in Smad7 transfected group than either control or empty vector groups (1.053 ± 0.009 *vs* 0.984 ± 0.054, 0.986 ± 0.044, $P < 0.01$ or 0.05; 0.083 ± 0.026 *vs* 0.058 ± 0.050, 0.056 ± 0.064, all $P < 0.05$), TGF-β1 and collagen Ⅰ mRNA expression was significantly reduced in Smad7 transfected group than control and empty vector groups (0.961 ± 0.013 *vs* 1.039 ± 0.013, 1.032 ± 0.037; 0.592 ± 0.096 *vs* 0.767 ± 0.085, 0.770 ± 0.090, all $P < 0.01$). There were no statistically significant difference in change of collagen Ⅲ mRNA expression among the three groups. The difference of Smad7 mRNA and protein, TGF-β1, collagen Ⅰ and Ⅲ mRNA expression weren't statistically significant between control and empty vector groups.

CONCLUSION: Smad7 maybe has activity of anti-fibrosis through inhibiting TGF-β/Smad signaling.

Key Words: Smad7; Construction; Eukaryotic expression vector; Hepatic stellate cell

Yang XY, Yang Y, Zheng Y, Li R, Zhou T, Sun K, Chang XY, Chen WG. Construction of eukaryotic expression vector for rat Smad7 and its expression in hepatic stellate cell line HSC-T6. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3146-3151

摘要

目的: 构建并鉴定大鼠Smad7真核表达质粒, 观察外源Smad7对肝星状细胞HSC-T6的转染, 并进一步研究其对TGF-β1及Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA表达水平的影响.

方法: 采用基因重组技术将Smad7 cDNA插入真核表达载体pcDNA3.1(+), 构建大鼠Smad7真核表达质粒. 脂质体介导转染HSC-T6细胞, 分为正常对照组、空质粒组及转染组, G418筛选, 挑取阳性细胞, 运用Western blot检测Smad7蛋白表达情况, RT-PCR检测Smad7、TGF-β1及Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA的表达水平.

结果: 酶切和测序结果证实Smad7真核表达质粒构建成功. Smad7转染组与正常对照、空质粒组比较, Smad7 mRNA表达显著增加(1.053±0.009 *vs* 0.984±0.054, 0.986±0.044, $P<0.01$或0.05), 蛋白水平显著上调(0.083±0.026 *vs* 0.058±0.050, 0.056±0.064, 均$P<0.05$); Smad7转染组TGF-β1、Ⅰ型胶原mRNA表达降低(0.961±0.013 *vs* 1.039±0.013, 1.032±0.037; 0.592±0.096 *vs* 0.767±0.085, 0.770±0.090, 均$P<0.01$); Ⅲ型胶原mRNA表达差异无统计学意义. 正常对照、空质粒组Smad7 mRNA和蛋白水平、TGF-β1、Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA表达差异无统计学意义.

结论: Smad7可能参与TGF-β/Smad信号转导, 在一定程度上具有抗纤维化的生物学活性.

关键词: Smad7; **构建; 真核表达质粒; 肝星状细胞**

杨小艳, 杨勇, 郑勇, 李睿, 周婷, 孙侃, 常向云, 陈卫刚. 大鼠Smad7真核表达质粒的构建及在肝星状细胞中的表达. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3146-3151

http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3146.asp

0 引言

肝纤维化是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在肝脏过多沉积的结果, 其关键环节是肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活, HSC体外培养自行活化, 模拟了体内纤维化过程, 是很好的肝纤维化模型. 转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)是肝纤维化形成中最重要的细胞因子, 其信号传入依赖Smad完成, Smad7是TGF-β信号转导途径的主要抑制性蛋白, 具有抗纤维化的作用[1-2]. 本实验通过构建Smad7重组质粒, 诱导Smad7基因在HSC中的高表达, 观察其对细胞的影响, 研究其对TGF-β1及Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA的表达水平影响, 了解外源Smad7抗纤维化的效果, 为探索新的基因治疗途径提供实验依据.

■研发前沿

近年来, 基因治疗成为肝纤维化防治研究热点, 他是通过某种载体把起治疗作用的基因导入靶细胞, 合成具有治疗作用的蛋白, 从而达到治疗疾病的目的.

1 材料和方法

1.1 材料 pcDNA3.1(+)质粒为本课题组保留; 大肠埃希菌DH5α系石河子大学医学院新疆地方与民族高发病教育部重点实验室所赠; TRIzol Reagent RNA分离液、Lipofectmine2000转染试剂为美国Invitrogen公司产品; 反转录酶及限制性核酸内切酶*Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ购自日本TaKaRa公司; 琼脂糖、UNIQ-10小剂量质粒抽提试剂盒、PCR切胶回收试剂盒为加拿大BBI公司产品; Taq DNA多聚酶、异丙基硫代-B-D半乳糖苷、DNA Marker、二甲亚砜、二硫苏糖醇、甘氨酸、乙二胺四乙酸, 三羟甲基氨基己烷, 十二烷基磺酸钠, TEMED, 丽春红 *et al*购自上海Sangon; PVDF膜Millipore公司产品; 吐温-20购自Sigma公司; HSC-T6细胞由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所提供; 胎牛血清为HyClone公司产品; 1640培养基购自Gibco公司; Smad7 mAb购自R&D公司; 蛋白Marker(SM0671)购自MBI公司; 上海Sangon完成引物合成和基因测序.

1.2 方法

1.2.1 大鼠Smad7真核表达质粒的构建: 常规TRIzol法抽提大鼠肝组织总RNA, 逆转录成cDNA, PCR扩增Smad7目的片段, 引物见表1, 下划线示酶切位点(*Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ). $CaCl_2$法诱导DH5α制备感受态细胞. pcDNA3.1(+)及Smad7纯化后产物用*Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ双酶切, 纯化回收后连接, 构建成Smad7/pcDNA3.1(+)重组质粒. 进行重组质粒转化, 同时设阴阳性对照. 转化后Amp(+)培养基上可见单个散在菌落, 随机挑选单克隆, 接种于3 mL Amp(+)LB培养液中, 37℃ 250 r/min振摇12-14 h, 取1.5 mL菌液行小剂量质粒抽提, 电泳见阳性克隆质粒样双带, 双酶切鉴定行电泳检测酶切效果, 酶切证实的阳性克隆送上海生工测序.

1.2.2 细胞培养及质粒转染: HSC-T6细胞以2.8×10^6/L接种于6孔板中(2 mL/孔), 37℃, 50 mL/L CO_2培养24 h, 随机分为正常对照组、空质粒组和Smad7质粒转染组. 转染前弃去含血清双抗培养基, PBS冲洗后, 每孔加无血清无双抗的1640培养基2 mL, 将质粒24 μL和Lipofectmine2000 20 μL分别用500 μL 1640稀释, 各自混匀静置5 min后, 再混合, 静置20 min. 每孔加入500 μL混合液, 旋转混匀, 放入37℃孵育箱中, 6 h后更换

■相关报道
实验显示Smad7过度表达, 可有效阻止TGF-β信号传入, 并可以激活(CAGA)(9)-MLP-Luc区域, 从而导致胶原表达减少.

表 1 实验所采用基因引物序列及扩增片段长度

基因	上下游引物序列	扩增片段长度(bp)
Smad7 cDNA	5'-CTACCGAATTCATGTTCAGGACCAAACGA-3'	1287
	5'-TTCACCTCGAGGGCTACCGGCTGTTGAAGA-3'	
Smad7	5'-CTGTGTTGCTGTGAATCTTAC-3'	600
	5'-GCTGTAGGCCTTTTCATAGT-3'	
TGF-β1	5'-GGACTCTCCACCTGCAAGAC-3'	300
	5'-CCCCAGAAATCATCGAGAC-3'	
Ⅰ型胶原	5'-GACACTGAACCCTTTGTAATG-3'	399
	5'-GTGAAACTCCCGTCTGCT-3'	
Ⅲ型胶原	5'-AGCGGAGAATACTGGGTT-3'	288
	5'-TGTAATGTTCTGGGAGGC-3'	
GAPDH	5'-TCCCTCAACATTGTCAGCAA-3'	309
	5'-AGCTCCACAACGGATACATT-3'	

为含100 mL/L胎牛血清及0.1 U/L双抗的1640培养液(2 mL/孔), 继续培养.

1.2.3 G418筛选浓度的确定、HSC-T6细胞抗性克隆的筛选: 将细胞以2.8×10^6/L的密度接种培养板, 24 h后, 将G418与含血清的1640混合, 配成浓度为0-600 mg/L的液体, 隔日换液, 相应孔的浓度保持不变, 培养11 d, 以7-10 d 90%细胞致死量为最佳筛选浓度, 因此确定450 mg/L为最佳筛选浓度. 转染后的HSC-T6细胞加入450 mg/L G418筛选2 wk, 大部分未转染HSC-T6飘浮死亡, 改用浓度为200 mg/L G418, 更换含100 mL/L胎牛血清的1640培养基, 转染携带目的基因的HSC-T6细胞逐步形成克隆.

1.2.4 Western blot及RT-PCR检测正常对照、空质粒及转染组中Smad7表达: 收取细胞总蛋白, -20℃保存. Western blot步骤: 40 mL/L浓缩胶, 100 mL/L分离胶, 预染蛋白Marker 3.0 μL, 样本总蛋白20 μg/孔, 加样至100 mL/L SDS-PAGE中电泳60 V, 30 min后改电压为100 V, 90 min至溴酚蓝跑至胶最下面取胶, 同步化将蛋白转移至PVDF膜, 20 V, 50 min. 转膜后以50 mL/L脱脂奶粉TBST室温下封闭4 h; 加入适当浓度的一抗孵育(Smad7 1.0 μg/L, GAPDH 1∶1000)室温2 h后, 4℃过夜. TBST洗膜3次, 15 min/次, 加入适当浓度的结合HRP的二抗(1∶5000)孵育, 室温下轻摇2 h, 洗膜, 显影, 曝光. 细胞总RNA抽提及RT-PCR: TRIzol法提取各组HSC-T6细胞总RNA, 逆转录为cDNA, 进行PCR, 每组同时以GAPDH为内参照, 引物序列见表1. 各组Western blot, RT-PCR结果, 扫描图像后, 用多媒体凝胶成像分析系统测定Smad7蛋白和GAPDH蛋白, Smad7、TGF-β1、Ⅰ、Ⅲ型胶原和GAPDH mRNA积分光密度值, 并计算其比值, 因内参照GAPDH表达恒定, 比值高低可以作为目的基因表达的相对值.

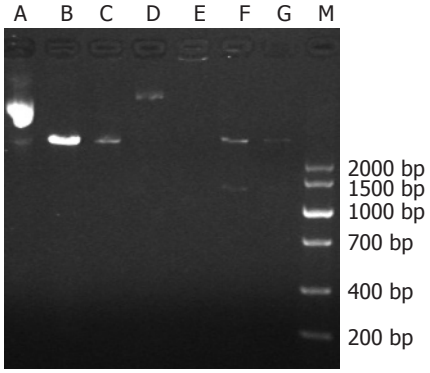


图 1 阳性克隆的双酶切鉴定结果. A: pcDNA3.1(+); B-C: pcDNA3.1(+)双酶切; D: Smad7/pcDNA3.1(+)真核表达重组质粒; E: 空白; F-G: Smad7/pcDNA3.1(+)真核表达重组质粒双酶切后; M: Marker.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件分析, 数据以mean±SD表示, 多个样本均数比较采用方差分析, P<0.05表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 阳性克隆的双酶切及序列测定 重组质粒双酶切后行琼脂糖凝胶电泳约在DNA Marker 1287 bp和5.4 kb附近可见两条明显条带, 与所需目的片段大小相符, 证实为阳性克隆(图1), 测序结果与GenBank中收录的序列号(NW_047516.2) Smad7的核苷酸序列同源性完全一致.

2.2 HSC-T6细胞克隆的筛选 转染后的HSC-T6细胞加入450 mg/L G418筛选2 wk, 大部分未转染HSC-T6飘浮死亡, 改用浓度为200 mg/L G418, 100 mL/L胎牛血清的1640培养基, 转染携带目的

表 2 Smad7、TGF-β1及Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA与Smad7蛋白的表达 (n = 6, mean ± SD)

分组	Smad7	TGF-β1	Ⅰ型胶原	Ⅲ型胶原	Smad7蛋白
正常对照组	0.984 ± 0.054	1.039 ± 0.013	0.767 ± 0.085	0.941 ± 0.024	0.058 ± 0.050
空质粒组	0.986 ± 0.044	1.032 ± 0.037	0.770 ± 0.090	0.944 ± 0.100	0.056 ± 0.064
Smad7转染组	1.053 ± 0.009[b]	0.961 ± 0.013[d]	0.592 ± 0.096[f]	0.910 ± 0.059	0.083 ± 0.026[h]

[b]P = 0.009, [d]P = 0.000, [f]P = 0.004, [h]P = 0.020 *vs* 正常对照组.

■应用要点
研究Smad7对TGF-β1及Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA的表达水平影响, 了解外源Smad7抗纤维化的效果, 为探索新的基因治疗途径提供实验依据.

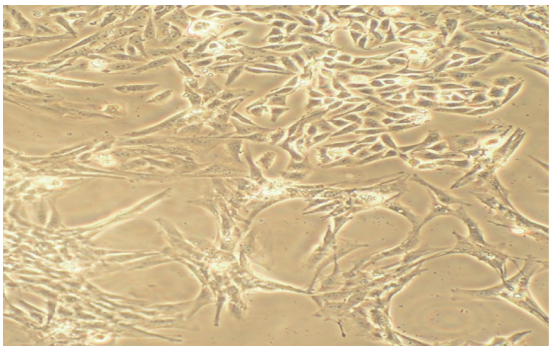


图 2 筛选后的HSC-T6细胞形成的克隆(×10).

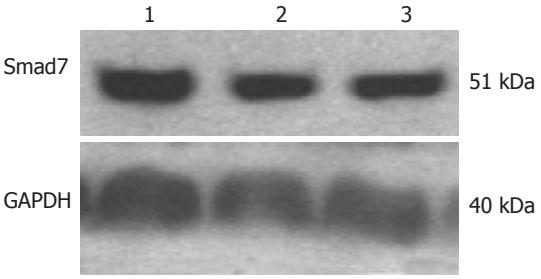


图 3 Smad7的Western blot. 检测Smad7转染组, 空质粒组及正常对照组中Smad7(1-3)蛋白的表达; GAPDH为内参照.

基因的HSC-T6细胞逐步形成克隆, HSC-T6细胞呈星形外观, 镜下见脂滴围绕在细胞核周围, 在胞质周围可见明显的细胞骨架, 表现为大量纤维束(图2).

2.3 正常对照组、空质粒组及转染组中Smad7蛋白的表达 所收集的细胞总蛋白完整清晰, 外源Smad7体外转染HSC-T6细胞后, Smad7蛋白表达水平显著上调, Smad7转染组与正常对照、空质粒组比较: 蛋白水平显著上调(P = 0.020, 0.026), 正常对照组、空质粒组Smad7蛋白水平表达差异无统计学意义(P = 0.644, 图3, 表2).

2.4 各组Smad7、TGF-β1及Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA的表达 Smad7转染组与正常对照组及空质粒组比较: Smad7 mRNA表达明显增加(P = 0.009, 0.011), TGF-β1及Ⅰ型胶原mRNA表达减少(P = 0.000, 0.000; P = 0.004, 0.004), 而Ⅲ型胶原mRNA表达差异无统计学意义(P = 0.950, 0.438), 正常对照组及空质粒组Smad7、TGF-β及Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA的表达差异无统计学意义(P = 0.944, 0.595, 0.967, 0.950, 图4, 表2).

3 讨论

肝纤维化是一个复杂的多因素作用过程, 以ECM的过度沉积为特征, Ⅰ、Ⅲ型胶原占健康肝脏胶原总量的80%, 在纤维化肝脏中则超过95%, 并以Ⅰ型胶原为主, 因此Ⅰ型胶原可作为反映胶原代谢的重要参数, 用于判断抗肝纤维化治疗的疗效[3].

TGF-β1是TGF-β超家族中对ECM合成与沉积失调而导致纤维化最重要的调节因子, 多种器官纤维化、硬化与之相关[4-7], 可激活HSC合成ECM, 抑制肝细胞再生, 诱导肝细胞凋亡[8]. 研究认为, 通过抑制TGF-β的产生或阻断其生物活性调控HSC以防治肝纤维化, 是器官纤维化的治疗靶标[9]. Breitkopf *et al*[10]研究表明阻止TGF-β的信号传导可用于慢性肝病的治疗, 可能阻止并逆转肝纤维化.

SMAD蛋白是唯一的TGF-β受体后信使分子, 介导TGF-β信号从细胞膜传入细胞核[1], 肝纤维化中TGF-β/SMAD信号传导是通过与受体依次结合、磷酸化实现的[11]. 首先, TGF-β与细胞膜上Ⅱ和Ⅰ型受体相继结合形成TGF-β-TβRⅠ-TβRⅡ三重复合物, TβRⅡ的激酶区使TβRⅠ磷酸化, 继而磷酸化细胞质中的R-Smads(Smad2和Smad3), 活化后的R-Smads与Smad4形成的复合物, 由胞质转入核内结合特定的序列, 协同转录因子上调或下调靶基因的表达, 产生生物学效应. 如HSC在TGF-β作用下活化, 转化为MFB, 增加合成和分泌胶原等ECM; 同时HSC又以自分泌和旁分泌方式, 上调TGF-β的表达, 加速肝纤维化的进行[12].

Smad7是TGF-β/SMAD信号传导中重要的负性调节因子, Smad7表达为TGF-β自身和其他信号途径所诱导, 提示Smad7在TGF-β信号途径

■同行评价
本研究技术路线得当，方法合理，结论可靠，具有一定的学术价值.

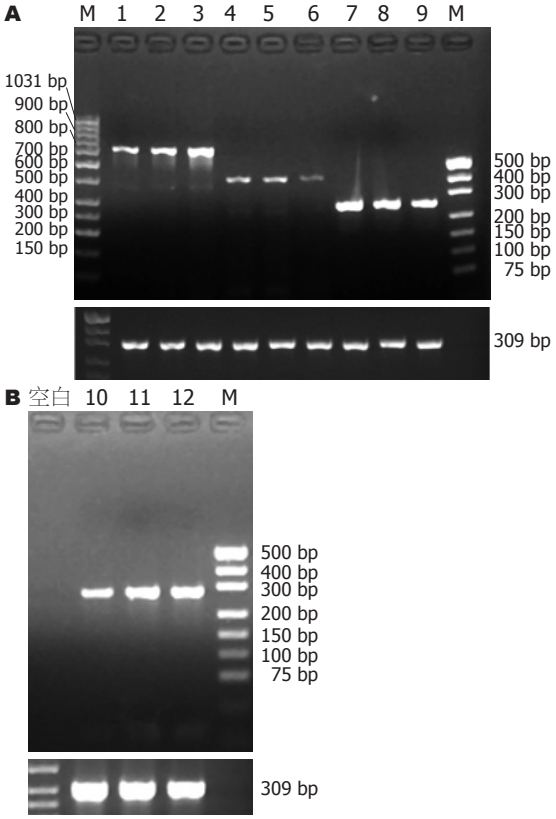


图 4 Smad7、TGF-β1及Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA的RT-PCR结果. A: Smad7及Ⅰ、Ⅲ型胶原; B: TGF-β1 mRNA. 1-3: 正常对照组, 空质粒组及Smad7转染组中Smad7; 4-6: Ⅰ型胶原; 7-9: Ⅲ型胶原 mRNA的表达; M: Marker.

的反馈及交叉调控中起关键作用[2], 其作用机制可能是Smad7可以与R-Smads竞争性同TβRⅠ结合从而抑制了R-Smads活化所介导的TGF-β信号传导, 阻断了TGF-β的作用通道, 导致ECM的合成减少, 发挥抗纤维化的作用.

近年来, 基因治疗成为肝纤维化防治研究热点, 他是通过某种载体把起治疗作用的基因导入靶细胞, 合成具有治疗作用的蛋白, 从而达到治疗疾病的目的.

Dooley *et al*[13]制备肝纤维化大鼠模型, 将带有Smad7 cDNA的腺病毒注射到模型体内, 实验显示Smad7过度表达, 可有效阻止TGF-β信号传入, 并可以激活(CAGA)(9)-MLP-Luc区域, 从而导致胶原表达减少.

基因克隆时, 选择合适的载体是关键, 同时载体是基因转染的关键. 目前常用的载体有质粒和病毒, 病毒载体感染效率较高, 但是其对细胞有直接的细胞毒性作用, 并可以诱发宿主的免疫反应, 影响目的基因的长期表达[14-17]. 本研究所选载体pcDNA3.1(+)是一个由人类巨细胞病毒启动子控制转录起始的表达质粒, 含氨苄青霉素(Amp)抗性基因, 便于做阳性克隆筛选; 含T7、BGH启动子, 为RNA聚合酶附着作用提供特异性识别位点; 含高效增强子SV40, 是一类能促进基因转录活性的顺式调控元件, 表现为: (1)无方向性; (2)远距离作用; (3)无基因特异性, 这样使其调控的基因可在哺乳动物细胞中获得稳定表达并在一定程度上保证了目的基因的稳定遗传.

我们成功构建Smad7/pcDNA3.1(+)重组质粒, 经酶切结合测序分析, 克隆到pcDNA3.1(+)中Smad7的ORF与GenBank中编码大鼠Smad7基因cDNA序列完全一致. 载体如何导入细胞及何时导入是实验顺利进行的关键. 实验中DNA转染真核细胞的常用方法有: 磷酸钙法、电转染法和基因枪法等, 以脂质体和病毒为载体的转染则常用于在体细胞的转染. 病毒载体由于自身蛋白质有较强的免疫原性而产生细胞毒性. 脂质体能提高分裂细胞和非分裂细胞对核酸的摄取, 并保护其不被降解, 具有操作简单、细胞吸收较好的优点, 并对特定细胞如肝星状细胞具有吸收倾向性, 本实验选用脂质体Lipofectmine2000, 细胞培养培养24 h后转染, 为排除外源性质粒DNA在转染时带来的生物学或免疫学效应, 我们设立了空质粒组. 为提高转导效率, 我们进行了G418筛选阳性克隆.

HSC体外培养自行活化, 模拟了体内纤维化过程, 是很好的肝纤维化模型. 本研究结果显示, Smad7 mRNA及蛋白水平均显著上调, 提示Smad7成功转染HSC-T6细胞, 可有效表达Smad7, 并影响TGF-β1及Ⅰ、Ⅲ型胶原mRNA的表达水平, 与正常对照及空质粒组相比, TGF-β1 mRNA表达降低, 并减少了Ⅰ型胶原mRNA的表达, Ⅰ型胶原合成减少, 可能减少ECM合成, 提示在一定程度上可能减轻肝纤维化.

实验结果显示上调Smad7基因表达对Ⅲ型胶原mRNA水平无明显影响, 这与阮艺华 *et al*研究结果相一致[18]. 尚有学者研究精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)三肽, 证实他存在于多种生物细胞外基质中, 能特异性识别细胞表面整合素并与之结合, 从而介导多种重要的生命活动[19-21], 他可以促进HSC胶原酶的表达, 从而增加胶原的降解, 他还具有拮抗TGF-β促进ECM分泌的作用[22-23]. 再者, 肝纤维化时, ECM的量和质均发生显著变化, 就胶原而言, Ⅲ型胶原在纤维化早期即明显增多, 但随纤维化进展, 可逐渐被Ⅰ型胶原替代. 本实验各组间Ⅰ胶原mRNA的表达水平

有差异, 而Ⅲ型则无, 是否与纤维化的程度有关, 其机制尚待进一步研究.

总之, 本实验表明外源Smad7可以在HSC-T6细胞有效表达, 由于Smad7高表达能够减少TGF-β信号传入, 并能显著抑制HSCⅠ型胶原mRNA表达, 这为进一步实验及探索新的基因治疗途径提供实验依据.

4 参考文献

1 Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471

2 Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 681-685

3 李才, 张一宁, 牛俊奇, 候芳玉, 黄三英, 李广生, 孙立波, 张得恒. 器官纤维化基础与临床. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 1-5, 49-51, 58-61

4 李瑾, 王宁宁, 谭若云, 郑东辉, 任胜利, 王笑云, 杨俊伟. Smad信号传递途径调节肾小管上皮细胞转分化实验. 肾脏病与透析肾移植杂志 2005; 14: 230-233

5 Ju CR, Xia XZ. The expression of Smad7 in the rats with pulmonary interstitial fibrosis and the therapeutic effect of IL-7. *Int J Respir* 2006; 26: 486-489

6 Li Z, Li J. Local expressions of TGF-beta1, TGF-beta1RI, CTGF, and Smad-7 in Helicobacter pylori-associated gastritis. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 1007-1012

7 Azuma H, Ehata S, Miyazaki H, Watabe T, Maruyama O, Imamura T, Sakamoto T, Kiyama S, Kiyama Y, Ubai T, Inamoto T, Takahara S, Itoh Y, Otsuki Y, Katsuoka Y, Miyazono K, Horie S. Effect of Smad7 expression on metastasis of mouse mammary carcinoma JygMC(A) cells. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1734-1746

8 Zhu ML, Partin JV, Bruckheimer EM, Strup SE, Kyprianou N. TGF-beta signaling and androgen receptor status determine apoptotic cross-talk in human prostate cancer cells. *Prostate* 2008; 68: 287-295

9 Schuppan D, Koda M, Bauer M, Hahn EG. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets? *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63: 366-370

10 Breitkopf K, Haas S, Wiercinska E, Singer MV, Dooley S. Anti-TGF-beta strategies for the treatment of chronic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 121S-131S

11 Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001; 502: 4-10

12 Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, Susztak K, Böttinger EP. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling. *Kidney Int Suppl* 2000; 77: S45-S52

13 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-191

14 Iizuka T, Kanzaki S, Mochizuki H, Inoshita A, Narui Y, Furukawa M, Kusunoki T, Saji M, Ogawa K, Ikeda K. Noninvasive in vivo delivery of transgene via adeno-associated virus into supporting cells of the neonatal mouse cochlea. *Hum Gene Ther* 2008; 19: 384-390

15 Abbink P, Lemckert AA, Ewald BA, Lynch DM, Denholtz M, Smits S, Holterman L, Damen I, Vogels R, Thorner AR, O'Brien KL, Carville A, Mansfield KG, Goudsmit J, Havenga MJ, Barouch DH. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. *J Virol* 2007; 81: 4654-4663

16 Khanam S, Rajendra P, Khanna N, Swaminathan S. An adenovirus prime/plasmid boost strategy for induction of equipotent immune responses to two dengue virus serotypes. *BMC Biotechnol* 2007; 7: 10

17 Perreau M, Mennechet F, Serratrice N, Glasgow JN, Curiel DT, Wodrich H, Kremer EJ. Contrasting effects of human, canine, and hybrid adenovirus vectors on the phenotypical and functional maturation of human dendritic cells: implications for clinical efficacy. *J Virol* 2007; 81: 3272-3284

18 阮艺华, 刘海林. Smad7质粒转染对肝星形细胞α1(Ⅰ)和α1(Ⅲ)前胶原基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2593-2596

19 Conway CL, Walker I, Bell A, Roberts DJ, Brown SB, Vernon DI. In vivo and in vitro characterisation of a protoporphyrin IX-cyclic RGD peptide conjugate for use in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* 2008; 7: 290-298

20 Madeja Z, Sroka J. Contact guidance of Walker carcinosarcoma cells by the underlying normal fibroblasts is inhibited by RGD-containing synthetic peptides. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40: 251-260

21 Das S, Banerji A, Frei E, Chatterjee A. Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. *Life Sci* 2008; 82: 467-476

22 Wang LS, Chen YW, Li DG, Lu HM. Arg-gly-asp-mannose-6-phosphate inhibits activation and proliferation of hepatic stellate cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1303-1307

23 Du SL, Pan H, Lu WY, Wang J, Wu J, Wang JY. Cyclic Arg-Gly-Asp peptide-labeled liposomes for targeting drug therapy of hepatic fibrosis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322: 560-568

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3152-3156
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

肝细胞生长因子对肝细胞癌侵袭和转移的影响

王庆军, 孙 抒, 李宏丹, 魏 嘉, 苏荣健

■背景资料
原发性肝癌的恶性程度高, 并且早期就有转移. 肝细胞癌的生长受体内多种因素的影响, 其中肝细胞生长因子对于促进肝细胞癌的侵袭和转移能力以及上皮-间叶转化发挥了重要的作用.

王庆军, 孙抒, 延边大学基础医学院病理学与法医学教研部 吉林省延吉市 133000
李宏丹, 魏嘉, 苏荣健, 辽宁医学院科学实验中心 辽宁省教育厅分子细胞生物学和新药开发重点实验室 辽宁省锦州市 121001
王庆军, 延边大学基础医学院病理学与法医学教研部在读硕士.
辽宁省博士启动基金资助项目, No. 20061074
作者贡献分布: 王庆军与苏荣健对此文所作贡献均等; 此课题由王庆军、孙抒、李宏丹、魏嘉及苏荣健共同设计; 研究过程也由王庆军、孙抒、李宏丹、魏嘉及苏荣健共同操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王庆军与苏荣健提供; 数据分析由王庆军、孙抒、李宏丹、魏嘉与苏荣健完成; 本论文写作由王庆军、孙抒与李宏丹完成.
通讯作者: 苏荣健, 121001, 辽宁省锦州市, 辽宁省教育厅分子细胞生物学和新药开发重点实验室. rongjiansu@yahoo.com.cn
电话: 0416-4673183
收稿日期: 2008-07-17 修回日期: 2008-09-06
接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-08

Effect of hepatocellular growth factor on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma

Qing-Jun Wang, Shu Sun, Hong-Dan Li, Jia Wei, Rong-Jian Su

Qing-Jun Wang, Shu Sun, Department of Pathology and Forensic Medicine College of Basic Medical Sciences, Yanbian University, Yanji 133000, Jilin Province, China
Hong-Dan Li, Jia Wei, Rong-Jian Su, Science Laboratory Center of Liaoning Medical College, Key Laboratory of Molecular Cell Biology and New Drug Development of the Educational Department of Liaoning Province, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
Supported by: the Liaoning Provincial Doctoral Foundation, No. 20061074
Correspondence to: Rong-Jian Su, Key Laboratory of Molecular Cell Biology and New Drug Development of the Educational Department of Liaoning Province, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. rongjiansu@yahoo.com.cn
Received: 2008-07-17 Revised: 2008-09-06
Accepted: 2008-09-08 Pubilshed online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of hepatocellular growth factor (HGF) on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma and the role of PI3 kinase in this process.

METHODS: Cell culture, Transwell assay, wound healing and WB technology were used to explore the effect of HGF on the invasion and metastasis of SMMC7721 cells. SMMC-7721 cells were then pretreated with PI3 kinase inhibitor LY294002 (10 μmol/L) and the effect of LY294002 on HGF was investigated.

RESULTS: Transwell assay and wound healing assay showed increased invasion and metastasis capacity of SMMC-7721 which was treated with HGF. WB showed raised expression of N-cad, MMP-2, MMP-9, Vimentin, and decreased expression of E-cad in HGF- treated SMMC-7721. When pretreated with LY294002 (10 μmol/L), SMMC-7721 was not influenced by HGF and no morphological change was observed. Transwell assay and wound healing assay had the same results as the non-treated SMMC-7721. WB showed no significant difference in expressions of N-cad, MMP-2, MMP-9, Vimentin and E-cad.

CONCLUSION: HGF promotes EMT of SMMC-7721, and PI3 kinase plays an essential role in this process.

Key Words: Hepatocellular Growth Factor; Hepatocellular carcinoma; EMT; PI3K

Wang QJ, Sun S, Li HD, Wei J, Su RJ. Effect of hepatocellular growth factor on the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3152-3156

摘要

目的: 研究HGF对肝细胞癌SMMC-7721的上皮-间叶转化的作用, 并对其机制进行探讨.

方法: HGF处理SMMC-7721后, 应用细胞培养、Transwell、划痕实验、WB技术研究HGF对肝癌细胞SMMC-7721上皮-间叶转化的作用. 并应用PI3 kinase抑制物LY294002 10 μmol/L预处理细胞, 观察SMMC-7721的变化, 研究PI3 kinase对于HGF作用机制的影响.

结果: Transwell和划痕实验显示HGF处理的细胞侵袭和转移能力增强, 蛋白印迹结果显示HGF处理的细胞的N-cad、MMP-2、MMP-9和Vimentin的表达增加, E-cad的表达减少. LY294002预处理后, 细胞不再受HGF的影响,

■同行评议者
高英堂, 研究员, 天津市第三中心医院, 天津市肝胆疾病研究所分子细胞室; 吴建国, 教授, 武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室

细胞的形态没有明显变化, Transwell和划痕实验结果与未经处理的SMMC-7721相同. 蛋白印迹结果显示: 细胞的N-cad、MMP-2、MMP-9、Vimentin和E-cad的表达变化不明显.

结论: HGF能够促进SMMC-7721的上皮间叶转化, 这种作用通过PI3 Kinase实现.

关键词: 肝细胞生长因子; 肝细胞癌; EMT; PI3K

王庆军, 孙抒, 李宏丹, 魏嘉, 苏荣健. 肝细胞生长因子对肝细胞癌侵袭和转移的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3152-3156

http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3152.asp

0 引言

肝细胞癌是一种常见的恶性肿瘤, 发病率居全球第5位[1], 随着近年来治疗方法的不断改进, 特别是肝移植在临床上的应用, 肝细胞癌患者的预后已经得到明显的改善. 但是, 由于肝细胞癌的高侵袭和高转移能力使得患者还是难以逃离复发的命运. 肝细胞生长因子(hepatocellular growth factor, HGF)是肝细胞分泌的一种具有较强刺激肝细胞增殖作用的多功能细胞因子, 其在肝细胞癌的表达明显增加. 他主要通过与细胞膜表面的c-Met受体结合而发挥生物作用. HGF与c-Met结合后, 促进受体自身的磷酸化, 进而导致含有Src同源结构域的多种底物磷酸化, 包括磷脂酶C、PI3K等[2], 在肿瘤的侵袭和转移方面HGF具有重要作用[3-5]. 但是关于HGF调节肝细胞癌侵袭和转移机制的研究国内外报道较少. 本实验应用细胞培养、Transwell、蛋白印迹等技术, 对HGF体外处理肝癌细胞SMMC-7721进行研究, 观察HGF对SMMC-7721上皮-间叶转化的作用, 探讨其作用机制, 为治疗肝细胞癌以及肝细胞癌的发病机制的研究提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 SMMC-7721购自中国科学院细胞库, HGF与LY294002购自Sigma公司. DMEM培养基购至Gibco公司, 胎牛血清购自天津, CO_2培养箱为德国Thermal产品.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与镜下观察: SMMC-7721细胞于含100 mL/L FBS, 100 g/L青霉素, 100 单位/mL链霉素的DMEM培养基中培养, 置于37℃, 50 mL/L CO_2培养箱培养, 细胞每3-4天换液, 细胞80%融合后1∶3传代. 每天观察记录.

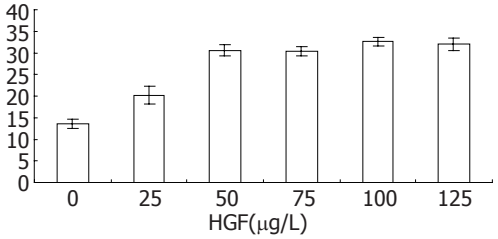


图 1 HGF不同浓度处理SMMC-7721的Transwell结果.

1.2.2 细胞处理: 观察HGF对SMMC-7721的侵袭和转移能力的影响: 取30代以内的细胞进行实验. 将细胞以2×10^9/L接种于六孔板中, 24 h后, 用PBS洗三次, 加入无血清DMEM+F12, 细胞饥饿12 h, 然后分别加入HGF 0、25、50、100 μg/L, 4 h后做Transwell计数细胞数, 筛选HGF最佳剂量. 观察LY294002对HGF的EMT作用的影响: 加入LY294002, 10 μmol/L预处理细胞1 h, 然后加入最佳浓度的HGF, 4 h.

1.2.3 划痕实验: 细胞长满单层后, 分别用最佳浓度的HGF和LY294002预处理的SMMC-7721做划痕试验, 用10 μL枪头在中间划一横线, 之后0、24 h分别观察照相.

1.2.4 Transwell实验: 将HGF、LY294002处理好的细胞含血清100 mL/L的DMEM培养基用悬浮, 以2×10^5接种于Fribronecting包被的Corning Transwell孔板其中的12个Transwell上, 上室每孔加入100 μL, 下室加入600 μL含血清200 mL/L的DMEM培养基. 12 h后, 取出上室, 用棉签蘸去上层的细胞, 加入100 mL/L新鲜配置的甲醛溶液固定30 min, 然后用Hochest 33285染色15 min. 甘油封片后用荧光显微镜检测细胞通过情况. 平均每个小室计数5个视野. 取平均值分析细胞的穿透能力.

1.2.5 Western blot检测: 将HGF、LY294002处理好的细胞, 用细胞刮刀刮下, 收集至EP管内. 用TBS漂洗后加入RIPA缓冲液(10 mL/L NP-40, 5 g/L脱氧胆酸钠, 10 g/L SDS, 1 g/L PMSF)裂解细胞, 考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度. 加热变性, SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 5%脱脂奶粉封闭过夜, 加入1∶1000倍稀释的一抗(E-cad、N-cad、MMP-2、MMP-9、Vimentin), 杂交2 h, β-actin作为内参. TBST洗膜后加入二抗温育1 h, TBST洗膜后进行BCIP/NBT显色, 采用Chemigenius凝胶成像系统分析目的蛋白的表达量.

2 结果

2.1 HGF处理SMMC-7721的最佳浓度 由Transwell实验结果显示50 μg/L的HGF是最佳的浓度(图1).

■相关报道

HGF、HGF受体对于肝细胞癌的侵袭和转移能力具有重要的作用. 他们对于肿瘤的治疗有着重要的影响. PI3K和MAPK信号通路在肿瘤的侵袭和转移过程中发挥着重要的作用, 现在的研究认为, HGF对于肝细胞癌的侵袭和转移能力的影响是通过多种信号通路实现的.

■创新盘点

本文以肝细胞癌SMMC-7721为研究对象, 用HGF处理, 观察其上皮-间叶转化作用, 并且探讨其发挥作用的机制. 研究发现HGF是通过PI3K信号通路发挥促进肝细胞癌的侵袭和转移作用.

■应用要点
本研究对于临床上治疗肝细胞癌，寻找抑制其侵袭和转移的新途径，以及开发抗肿瘤新药提供一个新的研究方向. 为肝细胞癌的研究提供一个新热点.

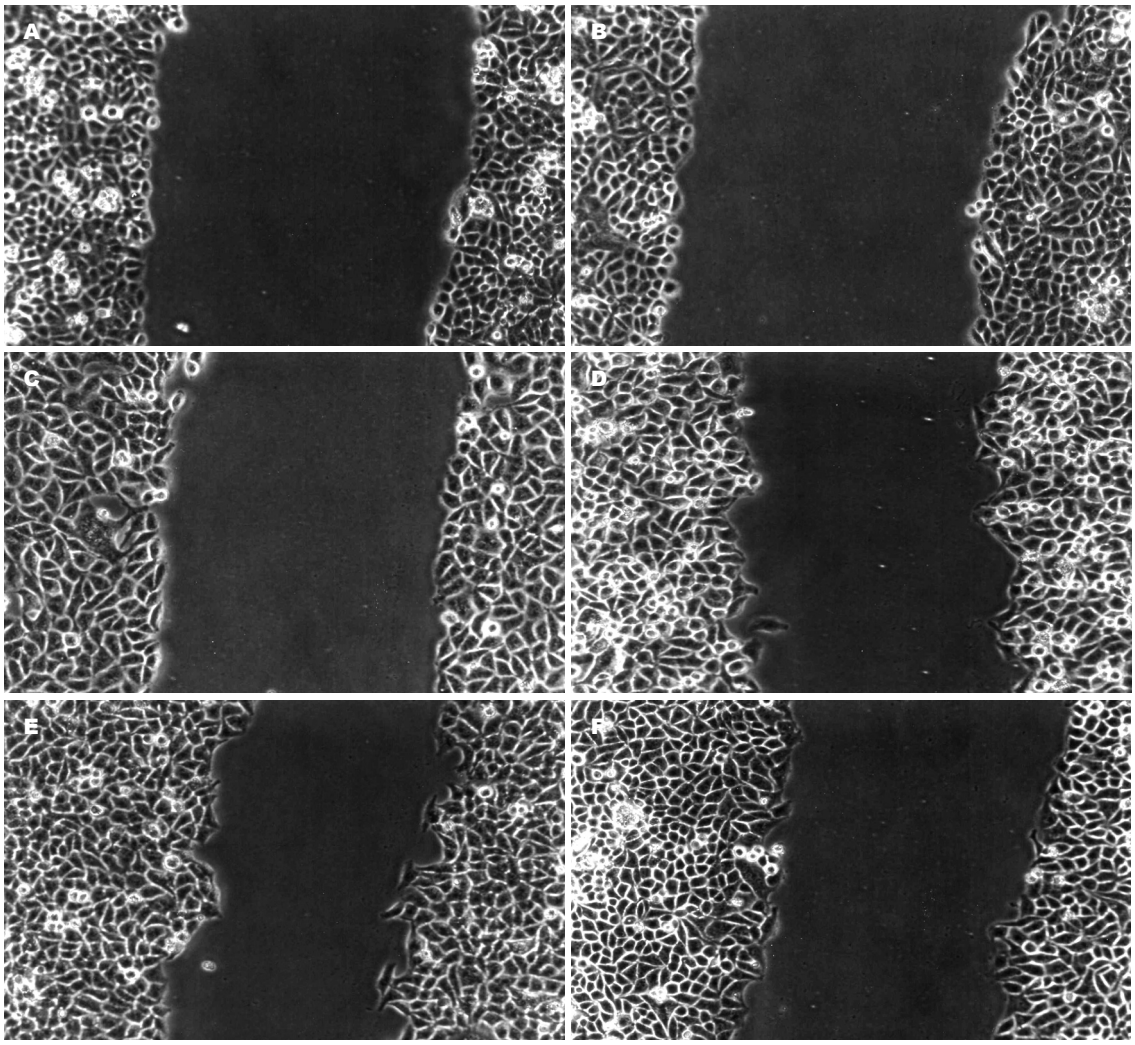


图 2 HGF处理后的细胞生长结果(×100). A−C: 划痕实验0 h细胞; D−F: 划痕实验24 h细胞; A, D: 未处理的SMMC−7721; B, E: HGF处理的SMMC−7721; C, F: LY294002预处理后加入HGF.

2.2 划痕实验结果 划痕实验可见HGF处理后的细胞，细胞的划痕愈合比未经处理的SMMC-7721快. 而经LY294002预处理后的细胞，细胞的划痕愈合情况也与不加HGF处理细胞的愈合情况相似，不再加快(图2).

2.3 Transwell实验 从实验结果可见，HGF处理组的细胞比要比未经HGF处理的SMMC-7721细胞多二倍以上，而当加入LY294002(PI3K抑制物)预处理后的SMMC-7721细胞侵袭能力明显下降(图3).

2.4 Western blot结果 细胞经HGF处理后的SMMC-7721，随着HGF浓度的增加E-cad的表达而明显降低，MMP-2、MMP-9的表达明显增高，N-cad的表达明显增加、Vimentin的表达明显增加. β-Actin作为内参. 而经LY294002预处理1 h后，HGF对于SMMC-7721的作用明显减弱，E-cad的表达与未经处理的SMMC-7721无差别，MMP-2、MMP-9的表达与HGF处理的SMMC-7721相比也有不同程度的减少，N-cad的表达也不再增加. Vimentin的表达不变(图4).

3 讨论

HGF与细胞膜上的特异性受体c-Met结合而激活其自身磷酸化而导致多种底物磷酸化，如磷脂酶Cγ，PI3K等. 从而引起细胞内一系列传导. 继而，发挥生物学功能，如促进细胞增殖、运动等[2].

由实验结果可见，HGF能够促进SMMC-7721的侵袭和转移能力，并且有一定的剂量依赖性，<50 μg/L时随着浓度的增加，侵袭和转移能力增强，>50 μg/L以后，侵袭和转移能力不再增强. Transwell实验显示SMMC-7721在HGF<50 μg/L时，随着HGF浓度的增加，细胞的侵袭能力明显增强，细胞的划痕愈合加快、穿透能力增强. 蛋白印迹结果显示：HGF处理后的SMMC-7721的E-cad的表达明显减少，E-cad是钙黏素家族的成员之一，他主要介导细胞与细

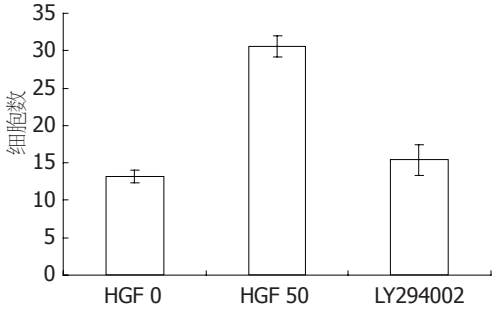


图 3 HGF与LY294002预处理后再加入HGF的SMMC-7721 Transwell结果.

胞之间的连接, 他的表达减少, 细胞之间的连接就会减弱, 促进了细胞的侵袭和转移. MMP-2, MMP-9是金属蛋白酶家族的成员, 他们能够水解基底膜和基质成分. 其表达的增加有利于肿瘤细胞的生长、侵润和转移. WB结果显示, HGF处理后的SMMC-7721的MMP-2、MMP-9的表达均明显升高, 也促进了SMMC-7721的侵袭和转移. 研究证实N-cad与Vimentin表达的增加有助于肿瘤的侵袭和转移能力. Vimentin, 即波形蛋白, 是细胞中间丝的一种蛋白, 多表达于间叶肿瘤中, 目前研究认为, N-cad与Vimentin表达的增加与肿瘤细胞的EMT呈正比[6-7]. HGF处理后的细胞, N-cad与Vimentin的表达均增加.

LY294002能够抑制HGF的EMT作用. LY294002是PI3K的抑制剂, 他能够抑制PI3K的活性. 当应用LY294002预处理SMMC-7721, 1 h后, 细胞的PI3K的活性被抑制, 当再加入HGF后, 细胞的形态学变化以及划痕实验、Transwell结果显示, 其对于SMMC-7721的EMT作用明显减弱. 在形态学上, 细胞的形态变化不如单纯HGF处理细胞变化明显, 划痕实验和Transwell结果也显示经LY294002预处理后, 再加入HGF也不会增加细胞划痕愈合速度、穿透能力也不再增强, 并且浓度组之间也无差别. 蛋白印迹结果显示, 经LY294002预处理后, E-cad的表达不再受HGF的影响, 与未处理的SMMC-7721的表达量相同. 因而, LY294002能够抑制了细胞的EMT, 减弱了细胞的侵袭和转移能力. MMP-2, MMP-9的表达也受到LY294002的抑制作用, 表达量明显减少. 减弱了HGF处理SMMC-7721的侵袭能力. 经LY294002处理后的细胞, N-cad与Vimentin的表达也不再增加, 而是与SMMC-7721的表达程度接近. 细胞的侵袭和转移能力减弱.

总之, HGF能够增强SMMC-7721的上皮-间叶转化能力[8-9], 侵袭和转移能力, 降低细胞的黏附能力. 其机制与PI3K有关[10], HGF通过与c-Met结合[11-12]后激活了PI3K, 继而引起一系列的细胞内信号传导, 促进了肝细胞癌SMMC-7721的上皮-间叶转化.

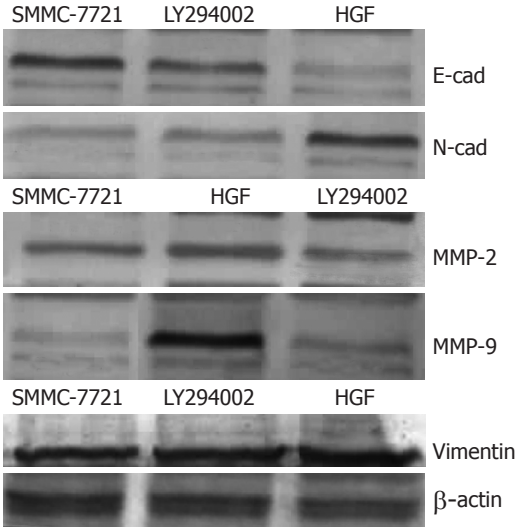


图 4 Western blot检测结果.

■名词解释

EMT(上皮-间叶转化): 具有极性的上皮细胞转化成为具有活动能力的间质细胞并获得侵袭和迁移能力的过程,他存在于人体多个生理和病理过程中. EMT的发生涉及到多个信号转导通路和复杂的分子机制,与钙连接素、生长因子、转录因子、微环境等有关. EMT与肿瘤细胞的侵袭和转移关系密切.

4 参考文献

1 Bräu N, Fox RK, Xiao P, Marks K, Naqvi Z, Taylor LE, Trikha A, Sherman M, Sulkowski MS, Dieterich DT, Rigsby MO, Wright TL, Hernandez MD, Jain MK, Khatri GK, Sterling RK, Bonacini M, Martyn CA, Aytaman A, Llovet JM, Brown ST, Bini EJ. Presentation and outcome of hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients: a U.S.-Canadian multicenter study. *J Hepatol* 2007; 47: 527-537

2 Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, Ma PC, Morrison PT, Salgia R. Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13: 41-59

3 Trusolino L, Cavassa S, Angelini P, Andó M, Bertotti A, Comoglio PM, Boccaccio C. HGF/scatter factor selectively promotes cell invasion by increasing integrin avidity. *FASEB J* 2000; 14: 1629-1640

4 Kermorgant S, Aparicio T, Dessirier V, Lewin MJ, Lehy T. Hepatocyte growth factor induces colonic cancer cell invasiveness via enhanced motility and protease overproduction. Evidence for PI3 kinase and PKC involvement. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1035-1042

5 Yano H, Hara A, Murase S, Hayashi K, Ando H, Shinoda J, Shimokawa K, Sakai N. Expression of hepatocyte growth factor and matrix metalloproteinase-2 in human glioma. *Brain Tumor Pathol* 2001; 18: 7-12

6 Yoon WH, Song IS, Lee BH, Jung YJ, Kim TD, Li G, Lee TG, Park HD, Lim K, Hwang BD. Differential regulation of vimentin mRNA by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and all-trans-retinoic acid correlates with motility of Hep 3B human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2004;

■同行评价
本文的研究内容尚可, 实验数据较充足, 具有反映实验结果的图片资料, 科学结论较明确, 具有一定的新颖性.

203: 99-105
7 Nakajima S, Doi R, Toyoda E, Tsuji S, Wada M, Koizumi M, Tulachan SS, Ito D, Kami K, Mori T, Kawaguchi Y, Fujimoto K, Hosotani R, Imamura M. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4125-4133
8 Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potenti al value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 53: 35-69
9 Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Julien S, Prévost G, Zimber A, Ouelaa R, Bracke M, De Wever O, Gespach C. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat* 2008 Aug 19. *[Epub ahead of print]*
10 Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 2153-2160
11 Numata M, Ido A, Moriuchi A, Kim I, Tahara Y, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Miyata Y, Uto H, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor facilitates the repair of large colonic ulcers in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 551-558
12 Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, Zhang H, Yoshimura T, Kawazoe S, Eguchi Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1. *Hepatol Res* 2003; 27: 289-301

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 以下逐条陈述: (1)引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2)材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3)结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4)讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化．A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …. 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: $^{a}P<0.05$, $^{b}P<0.01$($P>0.05$不注). 如同一表中另有一套P值, 则$^{c}P<0.05$, $^{d}P<0.01$; 第3套为$^{e}P<0.05$, $^{f}P<0.01$. P值后注明何种检验及其具体数字, 如$P<0.01$, t = 4.56 *vs* 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用t/min, c/(mol/L), p/kPa, V/mL, t/℃表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小7.5 cm×4.5 cm, 必须使用双面胶条黏 贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5)致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3157-3161
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

人巨细胞病毒先天性潜伏感染再激活致小鼠肠炎

吴 琼, 王明丽, 黄 维, 赵 俊, 胡雪影, 黎锐平

吴琼, 王明丽, 黄维, 赵俊, 胡雪影, 安徽医科大学微生物学教研室 安徽省合肥市 230032
黎锐平, 安徽中医学院附属医院内镜中心 安徽省合肥市 230032
吴琼, 2007年安徽医科大学微生物学硕士. 主要从事组织工程、临床病毒学研究.
安徽省"十五"生物医药重大科技专项资助项目, No. 01303003
作者贡献分布: 吴琼, 王明丽及黎锐平对此文所作贡献均等; 此课题由吴琼, 王明丽及黎锐平设计; 研究过程由吴琼, 赵俊及胡雪影操作完成; 数据分析由黄维与赵俊完成; 本论文写作由吴琼, 王明丽及赵俊完成.
通讯作者: 黎锐平, 230032, 安徽省合肥市, 安徽中医学院附属医院内镜中心. lrp6518@sina.com.cn
电话: 0551-2838543
收稿日期: 2008-07-08 修回日期: 2008-08-13
接受日期: 2008-08-19 在线出版日期: 2008-10-08

Enteritis induced by reactivation of congenital latent infection of human cytomegalovirus in mice

Qiong Wu, Ming-Li Wang, Wei Huang, Jun Zhao, Xue-Ying Hu, Rui-Ping Li

Qiong Wu, Ming-Li Wang, Wei Huang, Jun Zhao, Xue-Ying Hu, Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province, China
Rui-Ping Li, Center of Endoscopy, Anhui Traditional Chinese Medical College, Hefei 230032, Anhui Province, China
Supported by: the Key Project of Biology Medicine during Tenth-five Period of Anhui Province, No. 01303003
Correspondence to: Rui-Ping Li, Center of Endoscopy, Anhui Traditional Chinese Medical College, Hefei 230032, Anhui Province, China. lrp6518@sina.com.cn
Received: 2008-07-08 Revised: 2008-08-13
Accepted: 2008-08-19 Published online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To establish the model of hemorrhagic necrotic enteritis induced by reactivation of congenital latent infection of human cytomegalovirus (HCMV) in aged mice, and to explore the pathogenic mechanism of HCMV reactivation.

METHODS: Congenital latent HCMV-infected mice were raised in specific pathogen free (SPF) barrier system for 18 months. Eighteen virus-infected mice served as controls and 9 offspring mice were both treated with cyclophosphamide to reactivate the HCMV infection. Each group of the mice was sacrificed to obtain small intestine tissues for virus isolation. The expression of HCMV UL83 mRNA was determined using polymerase chain reaction (PCR), reverse transcription PCR (RT-PCR), HE staining and immunofluorescence with aseptic technique.

RESULTS: HCMV was isolated from the supernatant of small bowel tissue homogenate only in the group of infection-reactivated mice. Under microscopy, cytopathic effect caused by endogenous multiplication of HCMV in HF was observed. HCMV UL83 DNA was detected using PCR in the supernatant of cell culture with cytopathogenic effect (CPE). Masccline signal of apple green was seen using immunofluorescence. Pathological changes in bowels consisted of swollen cytoplasm, destroyed nuclei of enterocyte, distinct intranuclear inclusion in the enterocyte, and predominant infiltration of phagocytes. HCMV DNA was found by PCR in the group of infection-reactivated and latently-infected mice, but HCMV mRNA was only found in the group of infection-reactivated mice by RT-PCR.

CONCLUSION: A rat model of enteritis induced by reactivation of congenital latent HCMV infection was successfully established, and its pathological presentations indicate hemorrhagic necrotic enteritis.

Key Words: Human cytomegalovirus; Infection reactivation; Enter-disease

Wu Q, Wang ML, Huang W, Zhao J, Hu XY, Li RP. Enteritis induced by reactivation of congenital latent infection of human cytomegalovirus in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3157-3161

摘要

目的: 建立人巨细胞病毒(HCMV)先天性潜伏感染再激活致出血性坏死性肠炎BALB/c小鼠模型, 为HCMV致小肠炎发病机制及临床特异性诊断和抗病毒治疗奠定基础.

方法: 将HCMV先天性感染的小鼠饲养于SPF

■**背景资料**
近年来的研究表明, 胃肠道疾病与巨细胞包涵体病有关, 但其发生机制, 临床诊断机制研究、药物筛选及疫苗的研制和应用尚不明确.

■**同行评议者**
赵平, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室; 李杰, 副教授, 北京大学医学部基础医学院病原生物学系

■研发前沿
近年来, 关于消化道疾病与HCMV的研究已有部分报道, 但目前临床上对HCMV所致消化道感染仍不能明确诊断和有效治疗.

级屏障系统中, 18 mo后, 分别取病毒感染组18只、细胞对照组9只, 并按随机原则分别给病毒感染组中9只小鼠以及细胞对照组小鼠注射环磷酰胺, 建立HCMV潜伏再激活感染鼠模型. 采用无菌操作技术分别取细胞对照组、病毒潜伏组和病毒潜伏再激活组小鼠小肠组织, 进行病理组织学检查、体外细胞共培养分离病毒、PCR和RT-PCR检测HCMV UL83基因DNA及mRNA, 间接免疫荧光鉴定等.

结果: 病毒潜伏感染再激活组细胞共培养病毒分离实验发现小鼠小肠组织内病毒分离阳性, 在镜下可见HCMV在HF细胞内增殖产生特征性细胞病变, 病毒分离共培养物PCR检测到HCMV UL83 DNA, 间接免疫荧光检测可见苹果绿色阳性信号; 小鼠小肠组织PCR和RT-PCR分别检测到HCMV UL83 DNA和相应mRNA; HE染色镜检发现部分肠组织有非特异性小肠炎性病变, 有局灶性坏死及出血. 而病毒潜伏组仅小肠组织PCR检测到HCMV UL83 DNA, 出血和坏死现象不是很明显; 细胞对照组均是阴性.

结论: 成功构建了HCMV先天潜伏感染再激活小鼠小肠炎模型, 病理表现为出血性坏死性肠炎.

关键词: 人巨细病毒; 潜伏再激活感染; 肠道疾病

吴琼, 王明丽, 黄维, 赵俊, 胡雪影, 黎锐平. 人巨细胞病毒先天性潜伏感染再激活致小鼠肠炎. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3157–3161
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3157.asp

0 引言

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)属β-疱疹病毒亚科, 是一种双股线形DNA病毒. HCMV在人群中感染非常普遍, 大多呈潜伏感染状态[1], 血清学检测发现: 发达国家及发展中国家的成人感染率分别为60%和90%[2-3]. HCMV已是胎儿先天性感染的最重要病因之一. 先天性感染又称宫内感染: 指由HCMV感染母亲所生育的子女于生后14 d内证实有HCMV感染[4]. 在新生儿中有0.2%-2.2%发生HCMV的先天性感染[5], 90%的先天性感染婴儿不出现明显的临床症状[6], 由于感染后病毒不能被彻底清除, 先天性感染后常出现HCMV长期或终生存在于宿主体内, 表现为潜伏感染状态. 此时患者体内无感染性子代病毒颗粒产生, 但在潜伏感染的细胞内可发现以不同形式存在于细胞核内的病毒基因组及其部分转录产物; 此种潜伏状态可被外来刺激因素(如机体免疫状态改变)激活而形成活动性感染. 潜伏感染状态对健康个体并没有危害, 而对免疫功能低下者, 如器官、骨髓移植患者和艾滋病患者等, 可导致视网膜炎、肺炎及脑炎等严重危及生命的疾病. HCMV潜伏感染还是老年人群的重要免疫风险表型(immune risk phenotype, IRP), 直接影响老年人的健康和寿命. Powell *et al*[7]研究报道, 溃疡性结肠炎与巨细胞包涵体病有关, 近年来的研究表明, HCMV感染可导致胃肠道疾病, 尤其以婴幼儿、器官移植及艾滋病患者多见, 在这些病例中, 患者大多以急性肠炎、溃疡性结肠炎等多见, 少数发生胃肠道肿瘤[8]. 该病毒所致的胃肠病理改变主要为典型的黏膜充血、水肿、溃疡、出血、坏死等, 临床表现主要为腹痛、腹泻、消化道出血或穿孔等, 少数患者出现中毒性巨结肠症状. 这些患者在检测出HCMV之前一般均接受了一段时间的皮质激素治疗, 部分患者接受免疫抑制治疗和结肠切除术等, 死亡率高达44%[9]. 由于目前临床上对HCMV所致消化道感染尚不能明确诊断和有效治疗, 针对这一现况, 我室在长期从事人巨细胞病毒致病机制研究基础上, 结合临床需求, 建立了HCMV潜伏再激活致小鼠小肠炎模型, 观察到HCMV对小肠有明显致病作用. 现将结果报告如下.

■创新盘点
本次实验建立了HCMV先天性潜伏感染的小鼠模型, 通过环磷酰胺的再激活, 成功构建了小鼠的肠炎模型.

1 材料和方法

1.1 材料 HCMV UL83基因引物是采用Primer5.0软件设计, 由上海生工生物技术服务有限公司合成. HCMV UL83(HCMV主要被膜磷蛋白pp65编码的基因, 位于119352-121037, 全长1686 bp)引物: Primer: (sense)5'-GAG GAC CTG ACG ATG ACC CG-3'(antisense)5'-TCT GAC CCT GAA CCG TAG CC-3'此对引物分别位于HCMV UL83基因第754-773 bp和1500-1519 bp处, DNA和mRNA的产物长度皆为766 bp. 莱卡倒置荧光显微镜(Leica德国)、基因扩增仪(Hema8000, 珠海黑马医学仪器有限公司)、紫外凝胶成像系统(BioSens SC720型)等. 6-8代的人成纤维细胞株(HF), 安徽医科大学微生物教研室制备. HCMV AD169株由上海复旦大学医学院微生物学教研室提供, 使用前进行病毒复苏及增毒.

1.2 方法

1.2.1 分组和造模: 参考文献[10-11], 本实验分为3组: 细胞对照组、病毒潜伏组和病毒潜伏再

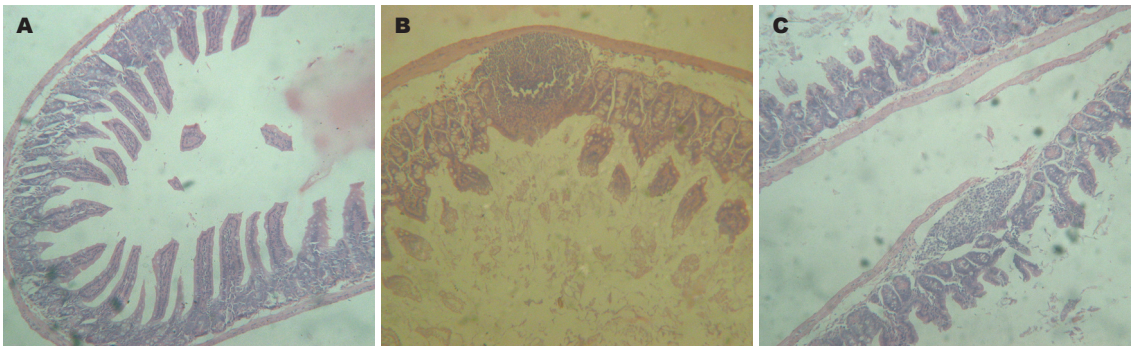


图 1 小鼠小肠病理切片HE染色结果(×100). A: 正常对照组; B: HCMV感染组; C: HCMV感染再激活组.

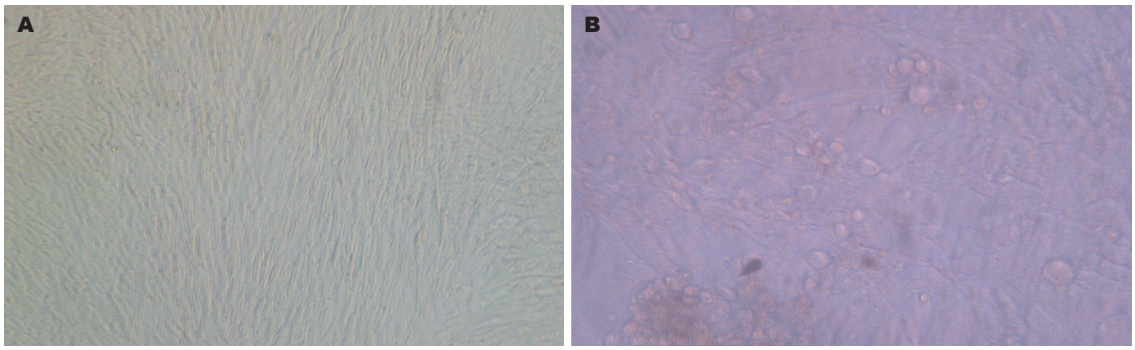


图 2 小鼠小肠组织病毒分离结果观察(未染色×200). A: 正常HF细胞对照组; B: HCMV感染再激活组.

■应用要点

本研究建立的HCMV先天性潜伏感染的小鼠模型, 为研究HCMV先天性潜伏感染再激活导致严重临床消化系病症的临床诊断机制、药物筛选及疫苗研制和应用提供了可靠的实验平台.

激活组. 首先建立HCMV先天性感染小鼠的模型, 将子代小鼠(病毒感染组、细胞对照组)饲养于SPF级屏障系统中18 mo, 期间小鼠生长, 发育状况正常, SPF级屏障系统由上海市实验动物质量监督检验站检测. 本次实验从子代小鼠中分别取病毒感染组18只、细胞对照组9只. 随机将病毒感染组中半数进行环磷酰胺激活, 建立HCMV潜伏再激活感染鼠模型. 将细胞对照组和病毒潜伏再激活组即病毒感染组小鼠按照实验设计注射环磷酰胺(剂量150 mg/kg, 每6天1次, 共3次), 最后1次激活后6 d颈椎脱臼处死动物, 无菌取小肠组织进行有关检测.

1.2.2 病理学观察: 取处死后小鼠的小肠组织, 常规病理固定, 石蜡包埋切片, HE染色, 光镜下观察.

1.2.3 体外细胞共培养分离病毒: 参照文献病毒分离[12], 无菌取小鼠小肠组织, 将其制备成1×10^9/L肠细胞悬液, 取细胞悬液接种到已经长满单层HF细胞的12孔培养板内, 37℃、50 mL/L CO_2培养箱培养, 同时设正常细胞对照及HCMV AD169株阳性对照(各组均做3孔). 24 h后换维持液, 1 wk后盲传, 每周1次, 共3次. 观察CPE.

1.2.4 体外细胞共培养物PCR鉴定: 对出现特征性CPE者, 取上清液检测HCMV DNA. 按常规碱裂解法抽提小鼠小肠组织及细胞中的DNA, 并以此为模板进行PCR扩增(条件: 95℃ 2 min, 95℃ 1 min, 62℃ 45 s, 72℃ 1 min, 72℃ 10 min, 30循环), 将PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 经紫外透射仪观察凝胶电泳情况后, 再利用紫外凝胶成像系统拍照、记录.

1.2..5 体外细胞共培养物免疫荧光鉴定: 载有单层细胞培养物的盖玻片经40 g/L多聚甲醛固定后加10 g/L Triton×100, 37℃作用10 min, 加5%脱脂奶粉稀释的HCMV pp65 mAb的一抗(1∶30)以盖满标本为准, 置于湿盒中4℃过夜, PBS 洗涤3次后, 覆盖上伊文斯蓝稀释的羊抗小鼠FITC-IgG(1∶30), 37℃作用1 h后PBS洗涤3次. 900 mL/L甘油封片, 荧光显微镜下观察并记录结果.

1.2.6 小鼠小肠组织PCR及RT-PCR鉴定: 按常规方法抽提小鼠小肠组织中的DNA和RNA(RNA用DNA酶处理), 然后分别进行PCR、RT-PCR以及电泳检测等.

统计学处理 用SPSS11.0软件对实验数据进行录入统计, 结果以mean±SD表示, $P<0.01$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 HE染色观察小鼠小肠病理学变化结果 通过

■名词解释
1 先天性感染: 又称宫内感染, 指由HCMV感染母亲所生育的子女于生后14 d内证实有HCMV感染.
2 潜伏感染再激活: 病毒的潜伏感染状态在外来刺激因素的作用下, 被激活而形成复发性感染, 从而导致免疫功能尚未成熟或低下的个体表现出明显的临床症状.

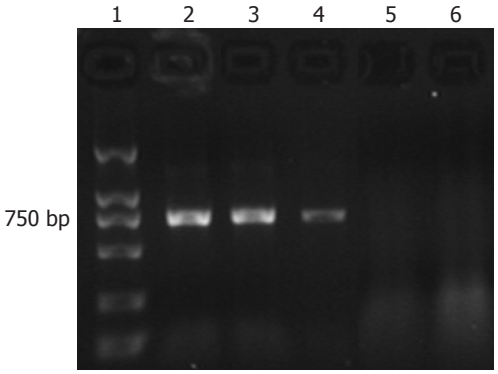


图 3 体外细胞共培养物HCMV UL83 PCR产物电泳结果. 1: Marker DL2000泳道; 2: HCMV PCR阳性对照; 3: HCMV先天性潜伏感染再激活组泳道; 4: HCMV先天性潜伏感染组; 5: 细胞对照组泳道; 6: HCMV PCR阴性对照.

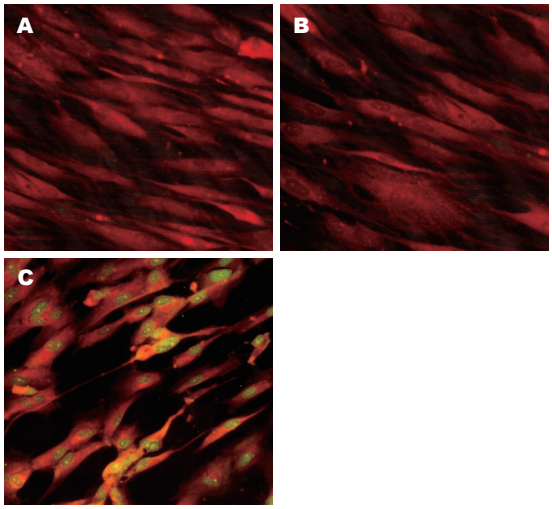


图 4 小鼠小肠细胞培养物间接免疫荧光(×200). A: 细胞对照组; B: HCMV潜伏感染组; C: HCMV潜伏感染再激活组.

HE染色镜下观察, 发现病毒潜伏组以及病毒潜伏再激活组小肠黏膜结构已发生破坏, 被弥漫性出血所代替, 出血坏死已累及黏膜下肌层, 肠黏膜层可见大量炎症细胞呈弥散分布, 主要为淋巴细胞, 浆细胞及单核巨噬细胞. 肠黏膜部分绒毛及腺体已破坏, 层次结构消失, 坏死区被红色流出物所代替. 正常对照组小鼠小肠切片病理染色未见明显改变(图1).

2.2 体外细胞共培养病毒分离结果 细胞对照组及病毒潜伏组小鼠的小肠组织研磨过滤后接种HF细胞, 4 wk内未观察到HCMV特征性CPE, 盲传3代后, CPE仍为阴性. 用HCMV特异性引物扩增后, 未见特异性条带, 病毒潜伏再激活组小肠组织匀浆接种HF细胞后3 wk左右, HF细胞开始肿胀、核变大, 形成巨核细胞, 病变在3-4 wk时最明显, 呈局灶性(图2), 用HCMV UL83基因特异性引物扩增后, 可见特异性条带.

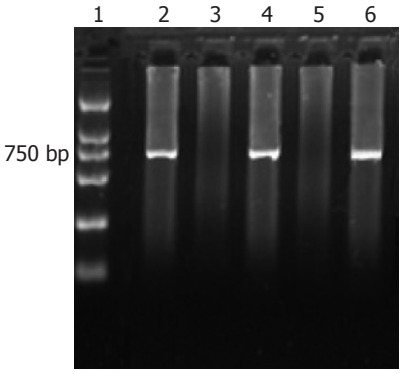


图 5 小鼠小肠组织HCMV UL83 PCR产物电泳结果. 1: Marker DL2000; 2: HCMV先天性潜伏感染组; 3: 细胞对照组; 4: HCMV先天性潜伏感染再激活组; 5: HCMV PCR阴性对照; 6: HCMV PCR阳性对照.

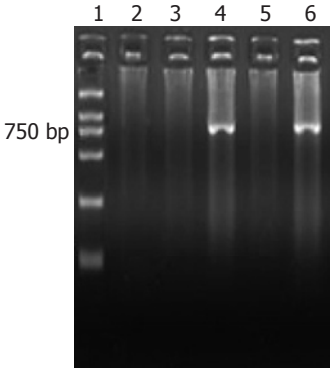


图 6 小鼠小肠组织 HCMV UL83 RT-PCR产物电泳结果. 1: Marker DL2000; 2: HCMV先天性潜伏感染组; 3: 细胞对照组; 4: HCMV先天性潜伏感染再激活组; 5: HCMV RT-PCR阴性对照; 6: HCMV RT-PCR阳性对照.

2.3 体外细胞共培养物PCR PCR检测病毒潜伏组激活前后小鼠小肠组织在766 bp处均可见到HCMV UL83基因特异性条带, 细胞对照组则均为阴性(图3).

2.4 间接免疫荧光结果 用HCMV pp65 mAb对HCMV先天性潜伏感染再激活组小鼠小肠细胞培养物进行间接免疫荧光检测, 可见苹果绿色荧光阳性信号位于被病毒感染的HF细胞的细胞核中, 并且随着培养时间的延长荧光信号逐渐增强, 胞核内出现阳性荧光信号. HCMV先天性潜伏感染组及细胞对照组均未见任何阳性信号(图4).

2.5 小鼠小肠组织PCR及RT-PCR结果 PCR检测病毒潜伏组激活前后小鼠小肠组织在766 bp处均可见到HCMV UL83基因特异性条带, 细胞对照组则均为阴性; RT-PCR产物凝胶电泳中只有病毒潜伏再激活组小肠组织在766 bp处显示有HCMV UL83基因的转录产物存在(图5-6).

3 讨论

HCMV在人群中感染非常普遍, 大多呈潜伏感染状态, 该状态下病毒不能被彻底清除, 而是以潜伏感染的状态长期或终生存在于宿主体内,

并且可被外来刺激因素(如机体免疫状态改变)激活而形成活动性感染. 近年来, Hertel *et al*学者提出HCMV感染与消化系统疾病存在一定相关性, 消化道上皮细胞既是HCMV攻击的靶细胞, 又是HCMV潜伏的位点[13]. 在炎症反应过程中, HCMV能刺激T细胞产生IL-2、TNF-β、INF-α等细胞因子, 调节白细胞迁移、HLA分子表达、抗原呈现, 诱导参与免疫反应的细胞黏附分子的表达[14], 进一步促进炎症反应, 加重疾病症状. 此外HCMV感染还可导致消化系统局部组织炎症、血管内皮细胞受损、黏膜缺血损伤, 最终导致血管闭塞、组织溃疡、出血、坏死等. 但由于没有良好的HCMV感染消化系统动物模型, 所以研究一直没有取得突破性进展.

本研究在已建立的HCMV先天性潜伏感染模型的基础上, 通过环磷酰胺降低HCMV先天性潜伏感染小鼠机体免疫力[15], 是潜伏感染的病毒再激活. 实验分为3组: 细胞对照组、病毒潜伏组和病毒潜伏再激活组, 采用细胞共培养病毒分离、间接免疫荧光、PCR及RT-PCR来确定模型的感染状态. 细胞共培养病毒分离试验发现病毒潜伏再激活组小鼠小肠组织分离出HCMV, 病毒分离阳性; 潜伏感染组以及细胞对照组小鼠病毒分离结果均为阴性; PCR以及RT-PCR结果显示, 病毒潜伏再激活组小鼠均呈阳性; 而病毒潜伏组小鼠HCMV UL83基因不转录, PCR可检测出UL83 DNA, RT-PCR检测不出相应的mRNA; 细胞对照组小鼠PCR、RT-PCR结果均为阴性. 以上结果说明本研究建立的小鼠模型感染状态与实验设计相符合. 病理学方法观察了小鼠发现病毒潜伏组以及病毒潜伏再激活组小鼠小肠组织黏膜结构已发生不同程度的病理损害, 尤其是再激活组被弥漫性出血所代替, 出血坏死可累及黏膜下肌层, 肠黏膜层可见大量炎症细胞呈弥散分布, 主要为淋巴细胞, 浆细胞及单核巨噬细胞. 肠黏膜部分绒毛及腺体已破坏, 层次结构消失, 坏死区被红色流出物所代替. 而细胞对照组小鼠小肠切片病理染色未见明显改变.

本试验通过对先天性潜伏感染的小鼠模型以及再激活的研究表明, 该模型可以较好地模拟人HCMV先天性感染后在患者体内长期潜伏以及潜伏再激活两种感染状态, 为研究HCMV先天性潜伏感染再激活导致严重临床消化道病症的临床诊断机制研究、药物筛选及疫苗的研制和应用提供了可靠的实验平台.

■同行评价

本研究成功建立了HCMV先天性感染再激活的小鼠模型, 观察到典型的肠炎病理改变, 对于进一步研究其致病机制具有一定价值, 不足之处在于一些研究结果或设计的严谨性有待斟酌.

4 参考文献

1 de Souza S, Bonon SH, Costa SC, Rossi CL. Evaluation of an in-house specific immunoglobulin G (IgG) avidity ELISA for distinguishing recent primary from long-term human cytomegalovirus (HCMV) infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2003; 45: 323-326

2 Drew WL, Paya CV, Emery V. Cytomegalovirus (CMV) resistance to antivirals. *Am J Transplant* 2001; 1: 307-312

3 Leśnikowski ZJ, Paradowska E, Przepiórkiewicz M, Olejniczak A, Emery VC. [Drugs against human cytomegalovirus] *Pol Merkur Lekarski* 2002; 13: 242-249

4 闻玉梅. 现代医学微生物学. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 926-936

5 Sweet C. The pathogenicity of cytomegalovirus. *FEMS Microbiol Rev* 1999; 23: 457-482

6 阎凤亭, 李芬. 先天性巨细胞病毒感染. 国外医学・妇幼保健分册 1998; 9: 161-164

7 Powell RD, Warner NE, Levine RS, Kirsner JB. Cytomegalic inclusion disease and ulcerative colitis; report of a case in a young adult. *Am J Med* 1961; 30: 334-340

8 Rahbar A, Boström L, Lagerstedt U, Magnusson I, Söderberg-Naucler C, Sundqvist VA. Evidence of active cytomegalovirus infection and increased production of IL-6 in tissue specimens obtained from patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 154-161

9 Hommes DW, Sterringa G, van Deventer SJ, Tytgat GN, Weel J. The pathogenicity of cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: a systematic review and evidence-based recommendations for future research. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 245-250

10 王明丽, 唐久来, 胡闻, 史百芬, 胡勇, 毕克菊, 李京培. 人巨细胞病毒先天性中枢神经系统感染小鼠模型的建立. 动物学报 2000; 46: 167-174

11 Mayo DR, Hsu HS, Lim F. Interactions between salmonellae and macrophages of guinea pigs. IV. Relationship between migration inhibition and antibacterial action of macrophages. *Infect Immun* 1977; 18: 52-59

12 王明丽, 曹慧, 史百芬, 李京培, 张广明, 聂红先, 何家艾. 特发性血小板减少性紫癜与HCMV活动性感染. 安徽医科大学学报 1996; 31: 16-18

13 Hertel L, Lacaille VG, Strobl H, Mellins ED, Mocarski ES. Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus. *J Virol* 2003; 77: 7563-7574

14 Hahn G, Revello MG, Patrone M, Percivalle E, Campanini G, Sarasini A, Wagner M, Gallina A, Milanesi G, Koszinowski U, Baldanti F, Gerna G. Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes. *J Virol* 2004; 78: 10023-10033

15 Ma J, Wang YL, Hu HM, Fox BA, Si LS. [Mechanism of augmented anti-tumor immunity in reconstituted lymphopenic mice immunized with melanoma vaccine] *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2005; 27: 708-712

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3162-3166
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

TGF-β1引发的上皮-间质转化与食管鳞癌浸润转移的关系

张红燕, 孙 洋, 李珊珊, 杨建萍, 阎爱华, 王新华, 王小军

■背景资料
食管癌是死亡率很高的恶性肿瘤之一, 尤其在我国河南省更常见. 目前已知肿瘤的浸润转移是导致恶性肿瘤患者死亡的主要原因, 因此研究肿瘤的浸润转移机制, 对于降低肿瘤患者的死亡率至关重要.

张红燕, 孙洋, 李珊珊, 杨建萍, 王新华, 王小军, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省肿瘤病理重点实验室 河南省郑州市 450052
阎爱华, 郑州大学基础医学院癌前研究室 河南省郑州市 450052
张红燕, 主治医师, 主要从事食管癌的基础与临床研究.
河南省科技攻关基金资助项目, No. 072102310042
作者贡献分布: 此课题由李珊珊设计主持; 由张红燕与孙洋操作完成并撰写论文; 杨建萍参与病理阅片; 王新华与王小军参与部分标本收集及数据处理; 阎爱华负责组织切片.
通讯作者: 李珊珊, 450052, 河南省郑州市二七区建设东路1号, 郑州大学第一附属医院病理科. lsspath@yahoo.com.cn
电话: 0371-65032580
收稿日期: 2008-07-08 修回日期: 2008-08-18
接受日期: 2008-08-26 在线出版日期: 2008-10-08

Relationship between TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition and infiltration, metastatis of esophageal squamous cell carcinoma

Hong-Yan Zhang, Yang Sun, Shan-Shan Li, Jian-Ping Yang, Ai-Hua Yan, Xin-Hua Wang, Xiao-Jun Wang

Hong-Yan Zhang, Yang Sun, Shan-Shan Li, Jian-Ping Yang, Xin-Hua Wang, Xiao-Jun Wang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Henan Key Laboratory of Tumor Pathology, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Ai-Hua Yan, Department of Precancerous Studies, Basic Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by: the Key Science and Technology Program of He'nan Province, No. 072102310042
Correspondence to: Professor Shan-Shan Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, 27 District, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. lsspath@yahoo.com.cn
Received: 2008-07-08 Revised: 2008-08-18
Accepted: 2008-08-26 Pubilshed online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To investigate the correlation of TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition to infiltration and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).

METHODS: One hundred ESCC specimens from January 2000 to December 2004 in our hospital were selected. For each specimen, the cancerous tissue and its remote normal mucosa were analyzed and compared. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of TGF-β1, E-cadherin and Vimentin proteins.

RESULTS: The expression rate of TGF-β1 protein was significantly higher in ESCC tissues than in normal tissues (85% *vs* 27%, $P < 0.01$), and the expression rate of TGF-β1 protein in deeply infiltrating group was significantly higher than that in superficially infiltrating group(91% *vs* 75%, $P < 0.05$); the expression rate of E-cadherin protein was significantly lower in ESCC tissues than in normal tissues (43% *vs* 85%, $P < 0.01$); the expression rate of Vimentin protein was higher in ESCC tissues than in normal tissues (23% *vs* 0%, $P < 0.05$). In esophageal carcinoma, the expression of TGF-β1 was negatively correlated to that of E-cadherin (T_b = -0.257, P = 0.013), but positively correlated to that of Vimentin protein (T_b = 0.163, P = 0.030); in addition, the expression of E-cadherin was negatively correlated to that of Vimentin protein (T_b = -0.379, P = 0.000).

CONCLUSION: Epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-β1 may be present in ESCC, and is possibly related to ESCC infiltration and metastasis.

Key Words: Epithelial-mesenchymal transition; Transforming growth factor-β1; Esophageal squamous cell carcinoma

Zhang HY, Sun Y, Li SS, Yang JP, Yan AH, Wang XH, Wang XJ. Relationship between TGF-β1-induced epithelial-mesenchymal transition and infiltration, metastatis of esophageal squamous cell carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3162-3166

摘要

目的: 探讨食管鳞癌中是否存在TGF-β1引发的EMT, 及其与食管鳞癌的浸润转移的关系.

方法: 选用郑州大学第一附属医院2000-01/2004-12食管鳞癌手术切除标本100例, 每例标本均选用癌组织中心及其远端正常黏膜对照. 采用免疫组织化学技术检测100例食管鳞

■同行评议者
王健生, 副教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

癌手术切除标本中的TGF-β1、E-cadherin和Vimentin蛋白的表达.

结果: TGF-β1蛋白在食管鳞癌组织中的表达明显高于正常黏膜(85% *vs* 27%, $P<0.01$), 其在深层浸润组中的表达高于浅层浸润组(91% *vs* 75%, $P<0.05$); E-cadherin蛋白在食管鳞癌组织中的表达明显低于正常黏膜(43% *vs* 85%, $P<0.01$); Vimentin蛋白在食管鳞癌组织中的表达高于正常黏膜(23% *vs* 0%, $P<0.05$); 食管鳞癌组织中, TGF-β1与E-cadherin表达呈负相关(T_b = -0.257, P = 0.013), 而与Vimentin表达呈正相关(T_b = 0.163, P = 0.030), E-cadherin与Vimentin表达呈负相关(T_b = -0.379, P = 0.000).

结论: 食管鳞癌中可能存在TGF-β1引发的EMT, 且可能与食管鳞癌的浸润转移有关.

关键词: 上皮-间质转化; 转化生长因子-β1; 食管鳞癌

张红燕, 孙洋, 李珊珊, 杨建萍, 阎爱华, 王新华, 王小军. TGF-β1引发的上皮-间质转化与食管鳞癌浸润转移的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3162-3166
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3162.asp

0 引言

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是胚胎发育、组织重建和伤口修复中的基础过程, 同时也是肿瘤浸润、转移的一个非常重要的机制[1]. TGF-β是一种具有多种功能的细胞因子, 已有研究发现TGF-β在诱发EMT中起关键作用[2-3]. 在EMT过程中表达下调的因子主要是上皮性标志物如E-cadherin, 表达上调的因子主要是间质性标志物(如Vimentin)[4]. 本研究应用免疫组化技术检测TGF-β1、E-cadherin和Vimentin蛋白在100例食管鳞癌组织中的表达, 旨在探讨食管鳞癌中是否存在TGF-β1引发的EMT, 及其是否与食管鳞癌的浸润转移有关.

1 材料和方法

1.1 材料 选用郑州大学第一附属医院2000-01/2004-12食管鳞癌手术切除标本存档蜡块100例, 每例标本均选用癌组织中心及其远端正常黏膜对照. 100例标本病理诊断均为鳞状细胞癌, 分化Ⅰ级23例, Ⅱ级66例, Ⅲ级11例; 浸润至浅层(黏膜下层及浅肌层)36例, 深层(深肌层及外膜)64例; 有淋巴结转移者22例, 未确认有淋巴结转移者78例. 免疫组织化学染色采用链霉卵白素-生物素过氧化物酶法(Streptavidin Peroxidase,S-P). TGF-β1兔抗人多克隆抗体为美国Santa Cruz公司产品, E-cadherin鼠抗人单克隆抗体、Vimentin鼠抗人单克隆抗体、S-P试剂盒及DAB均购自北京中杉金桥生物技术有限公司.

1.2 方法 TGF-β1以胞膜和胞质着色为阳性细胞. 每张切片随机观察5个高倍视野, 计数500个细胞中染色阳性细胞数, 按阳性细胞所占比例进行分级, <20%为(-), ≥20%为(+)[5]. E-cadherin以胞膜和胞质着色为阳性细胞. 结果判断参照sulzers分级法[6], 阳性细胞<10%为(-), ≥10%为(+). Vimentin以胞质着色为阳性细胞. 每张切片随机观察5个高倍视野, 计数500个细胞中染色阳性细胞数, 按阳性细胞所占比例进行分级, <10%为(-), ≥10%为(+).

统计学处理 所有数据均经SPSS13.0软件进行统计分析. 阳性率之间的比较采用χ^2检验, 阳性率间相关性采用Kendall等级相关进行比较. 以α = 0.05作为检验水准.

2 结果

2.1 TGF-β1蛋白在食管鳞癌组织中的表达及与临床病理特征的关系 TGF-β1蛋白在食管鳞癌组织中的阳性染色定位于细胞质. 100例食管鳞癌中TGF-β1蛋白阳性表达率明显高于正常黏膜(85% *vs* 27%, $P<0.01$); TGF-β1蛋白表达与肿瘤分化程度及淋巴结转移无关($P>0.05$), 但与肿瘤浸润深度有关($P<0.05$), TGF-β1蛋白在深层浸润组中的阳性表达率明显高于浅层浸润组(91% *vs* 75%, $P<0.05$, 表1, 图1).

2.2 E-cadherin蛋白在食管鳞癌组织中的表达及与临床病理特征的关系 E-cadherin蛋白在食管鳞癌组织中的阳性染色定位于细胞质. 100例食管鳞癌中E-cadherin蛋白阳性表达率明显低于正常黏膜(43% *vs* 85%, $P<0.01$); E-cadherin蛋白表达与肿瘤分化程度、浸润深度及淋巴结转移无关($P>0.05$, 表1, 图2).

2.3 Vimentin蛋白在食管鳞癌组织中的表达及与临床病理特征的关系 Vimentin蛋白在食管鳞癌组织中的阳性染色定位于细胞质. 100例食管鳞癌中Vimentin蛋白阳性表达率高于正常黏膜(23% *vs* 0%, $P<0.05$); Vimentin蛋白表达与肿瘤分化程度、浸润深度及淋巴结转移无关($P>0.05$, 表1, 图3).

2.4 食管鳞癌组织中TGF-β1、E-cadherin及Vimentin蛋白表达的相关性 100例食管鳞癌组织

■研发前沿
肿瘤的浸润转移是一复杂过程, 目前EMT在肿瘤浸润转移中的作用逐渐引起人们的关注. 已有研究发现TGF-β1在诱发EMT中起关键作用. TGF-β1引发的EMT及其促肿瘤浸润转移的机制是目前研究的热点.

■相关报道
Zavadil *et al*的实验证明TGF-β能够诱导培养基中正常细胞和转化细胞形态的改变以及EMT特征的出现; Han *et al*报道TGF-β1诱导皮肤鳞癌细胞发生EMT, 形成梭形细胞癌, 提示TGF-β1表达上调会开启EMT, 并导致肿瘤的浸润及转移.

■**创新盘点**
截至目前，有关EMT在食管鳞癌浸润转移中的研究鲜见报道，探讨食管鳞癌的EMT，有助于阐明食管鳞癌的浸润转移机制，并为食管鳞癌的治疗打开一个新的思路.

表 1 TGF-β1、E-cadherin及Vimentin在食管鳞癌组织中的表达及与临床病理特征的关系

	n	TGF-β1		*P*值	E-cadherin		*P*值	Vimentin		*P*值
		−	+		−	+		−	+	
正常	100/20	73	27		15	85		20	0	
食管鳞癌	100	15	85	0.000	57	43	0.000	77	23	0.038
分化程度										
Ⅰ级	23	4	19		14	9		17	6	
Ⅱ级	66	7	59		39	27		51	15	
Ⅲ级	11	4	7	0.080	4	7	0.341	9	2	0.871
浸润深度										
浅层	36	9	27		21	15		30	6	
深层	64	6	58	0.036	36	28	0.840	47	17	0.259
淋巴结转移										
无	78	9	69		47	31		58	20	
有	22	6	16	0.087	10	12	0.216	19	3	0.237

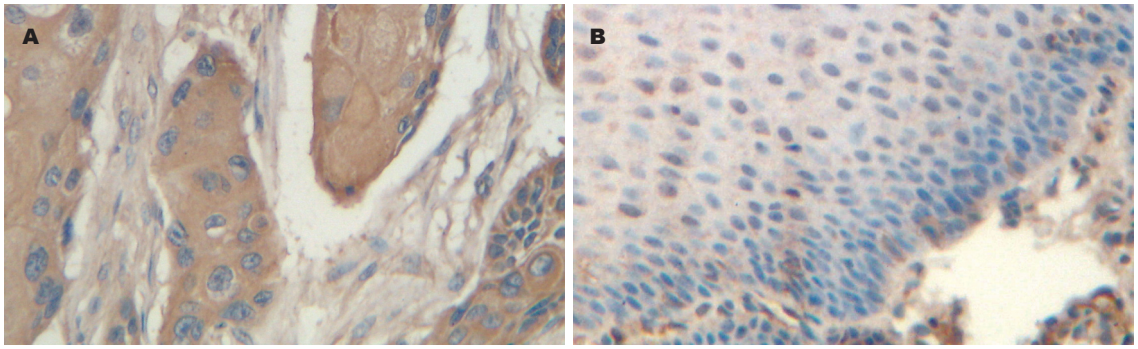


图 1 TGF-β1蛋白的表达(SP法 × 400). A: 食管癌组织，呈现胞质着色，表达较强; B: 正常上皮组织，呈现胞质着色，表达较弱.

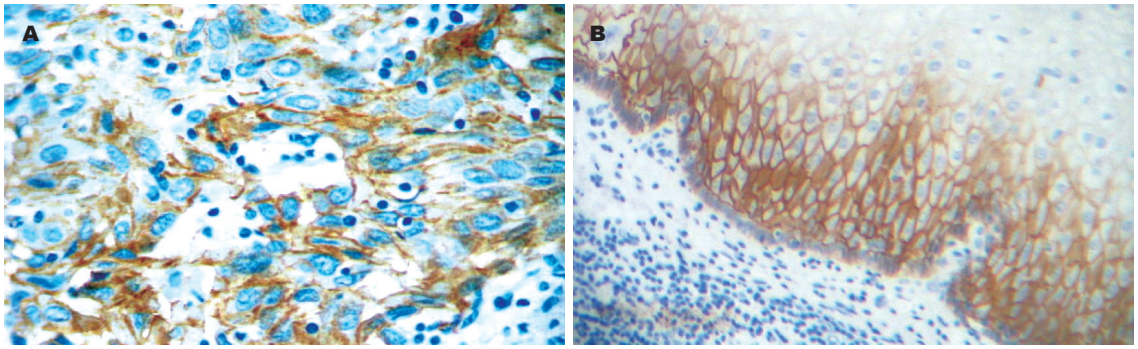


图 2 E-cadherin蛋白的表达(SP法 × 400). A: 食管癌组织，呈现胞质着色，表达较强; B: 正常上皮组织，呈现胞膜和胞质着色，表达较强.

■**应用要点**
本文研究结果表明食管鳞癌组织中TGF-β1的过表达与EMT有关，发生了EMT的食管鳞癌细胞运动能力及侵袭转移能力增强. TGF-β1可能通过对上皮性标志物E-cadherin和间质性标志物Vimentin的调控在食管鳞癌EMT及浸润转移中起关键作用，这对食管鳞癌发病机制的阐明和治疗具有一定的价值.

中，TGF-β1与E-cadherin表达呈负相关($P<0.05$)，而与Vimentin表达呈正相关($P<0.05$)，E-cadherin与Vimentin表达呈负相关($P<0.01$，表2-3).

3 讨论

食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一，河南省又是高发区域. 到目前为止，食管癌仍严重地危害着人们的生命健康，因此对食管癌浸润和转移机制的研究显得尤为重要和突出. EMT最早被发育生物学家用来描述在胚胎发育过程中某些特定部位的上皮细胞所发生的形态学改变. 例如在胚胎期器官形成的过程中，上皮细胞变得类似于成纤维细胞，从而具有了强大的移动能力. 发生EMT的上皮细胞在经历了短暂的结构改变后，细胞的迁移和运动能力增强，因此，通过EMT肿瘤细胞可获得侵袭转移能力.

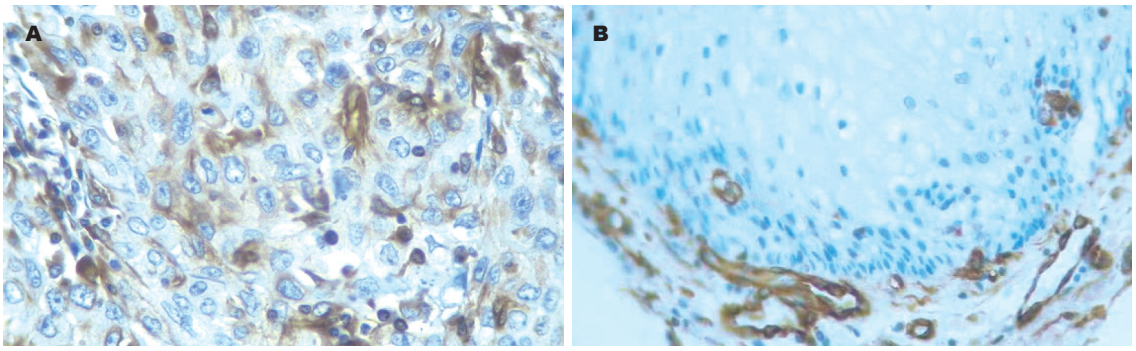


图 3 Vimentin蛋白的表达(SP法 × 400). A: 食管癌组织, 呈现胞质着色, 表达较强; B: 正常上皮组织, 细胞未着色.

■名词解释
上皮间质转化: 上皮细胞在与周围间质的相互作用过程中逐渐获得了某些间质细胞所特有的性状的现象. 最早被发育生物学家用来描述在胚胎发育过程中某些特定部位的上皮细胞所发生的形态学改变.

表 2 食管鳞癌组织中E-cadherin与TGF-β1, Vimentin表达的相关性分析

E-cadherin	TGF-β1		Vimentin	
	−	+	−	+
−	4	53	36	21
+	11	32	41	2
合计	15	85	77	23

T_b = −0.257, P = 0.013 *vs* TGF-β1; T_b = −0.379, P = 0.000 *vs* Vimentin.

表 3 食管鳞癌组织中TGF-β1和Vimentin表达的相关性分析

Vimentin	TGF-β1		合计
	−	+	
−	14	63	77
+	1	22	23
合计	15	85	100

T_b = 0.163, P = 0.030.

EMT的诱导因素来源于细胞外界刺激, 如多种细胞因子、生长因子以及缺血缺氧等, 其中生长因子在诱导肿瘤细胞EMT中的作用最受关注. TGF-β是一种多功能的多肽类细胞因子, 首先由Assoian *et al*[7]在1983年自人血小板中成功提取, 已被证实在多种生理病理过程中起重要作用. Zavadil *et al*[8]的实验证明TGF-β能够诱导培养集中正常细胞和转化细胞形态的改变以及EMT特征的出现, Han *et al*[9]报道TGF-β1诱导皮肤鳞癌细胞发生EMT, 形成梭形细胞癌. 提示TGF-β表达上调会开启EMT, 并导致肿瘤的浸润及转移. 为了探讨食管鳞癌中是否存在TGF-β1引发的EMT以及食管鳞癌的浸润转移是否与TGF-β1引发的EMT有关, 作者研究了食管鳞癌中TGF-β1的表达. 研究结果显示, 100例食管鳞癌中TGF-β1蛋白阳性表达率明显高于正常黏膜(85% *vs* 27%, P<0.01), 提示TGF-β1的高表达可能与食管鳞癌EMT有关. TGF-β1高表达的原因可能为: (1)肿瘤细胞失去对TGF-β1的敏感性而导致TGF-β1反馈性的表达增多; (2)肿瘤细胞自主分泌TGF-β1, 从而维持肿瘤细胞的侵袭力. 另外, 本研究结果还显示100例食管鳞癌中TGF-β1在深层浸润组的阳性表达率高于浅层浸润组(91% *vs* 75%, P<0.05), 说明发生了EMT的食管鳞癌细胞运动能力增强, 侵袭能力增强. TGF-β1促进肿瘤侵袭转移的机制可能为: (1)诱导有利于浸润转移的基质环境形成; (2)促进血管新生; (3)抑制宿主抗肿瘤免疫反应等.

E-cadherin是钙黏蛋白家族的一个重要成员, 是维持上皮细胞极性及细胞间黏附连接的主要分子[10]. Vimentin是细胞骨架的重要成分之一, 主要分布于间叶组织来源的细胞及某些未分化细胞. 现已发现, 在多种发生EMT的肿瘤中, E-cadherin表达下降或缺失, 而Vimentin异常高表达. 本研究结果显示100例食管鳞癌中E-cadherin蛋白阳性表达率明显低于正常黏膜(43% *vs* 85%, P<0.01), Vimentin蛋白阳性表达率高于正常黏膜(23% *vs* 0%, P<0.05), 进一步证实食管鳞癌细胞在发生恶性转化的过程中可能有EMT参与. 由于E-cadherin表达下降, 使得细胞形态改变, 细胞间连接变化, 允许肿瘤细胞摆脱细胞-细胞间连接而表现得更具侵袭性. 另外Vimentin表达增多使得细胞骨架结构变化, 上皮源性细胞由立方形变为纺锤形纤维样细胞, 更易于迁移游动, 而且细胞骨架作为细胞内外信号传递系统的载体, 其结构的变化可干扰信号传导系统的正常工作, 进一步导致细胞生物学性状改变, 如黏附性下降, 运动能力增强.

100例食管鳞癌中TGF-β1与E-cadherin表达

■同行评价
本研究方法合理,对照可靠,统计方法运用恰当,结果明确,并附有相应的图片资料,具有一定的科学性、可读性和创新性.

呈负相关($P<0.05$), 而与Vimentin表达呈正相关($P<0.05$). 此研究结果进一步说明了TGF-β1与EMT的关系. 由于食管鳞癌组织中TGF-β1的过表达, 导致上皮性标志物E-cadherin表达明显下降, 间质性标志物Vimentin表达明显增多, 结果使得细胞骨架重排, 上皮细胞变得类似于成纤维细胞, 从而引发EMT.

总之, TGF-β1诱导的EMT及其与食管鳞癌浸润转移的密切关系使其在食管鳞癌发病机制的阐明和治疗上具有一定的价值. 如果能够使具有间质特性的细胞恢复上皮细胞特性, 那么就有可能逆转EMT, 阻碍肿瘤浸润转移, 这将为食管鳞癌的治疗打开一个新的思路.

4 参考文献

1 Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 2003; 120: 1351-1383
2 Cho HJ, Baek KE, Saika S, Jeong MJ, Yoo J. Snail is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition by activating PI3 kinase/Akt signal pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353: 337-343
3 Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grünert S. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 2002; 156: 299-313
4 LaGamba D, Nawshad A, Hay ED. Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation. *Dev Dyn* 2005; 234: 132-142
5 中华病理学会杂志编辑委员会. 《全国免疫组织化学技术与诊断标准化专题研讨会》会议纪要. 中华病理学杂志 1996; 25: 326-328
6 Sulzer MA, Leers MP, van Noord JA, Bollen EC, Theunissen PH. Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1319-1323
7 Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1983; 258: 7155-7160
8 Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-5774
9 Han G, Lu SL, Li AG, He W, Corless CL, Kulesz-Martin M, Wang XJ. Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 1714-1723
10 Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 619-627

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3167-3171
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

CD133、Ki-67在胃癌的表达及临床病理意义

李亚卓, 王凤华, 赵 坡

李亚卓, 赵坡, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853
王凤华, 中国人民解放军208医院病理科 吉林省长春市 130062
李亚卓, 2008级中国人民解放军军医进修学院博士, 主要从事消化肿瘤的病理研究.
作者贡献分布: 此课题由李亚卓、王凤华及赵坡设计; 操作及写作由李亚卓完成.
通讯作者: 赵坡, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院病理科. zhaopo@301hospital.com.cn
电话: 010-66937736
收稿日期: 2008-07-09 修回日期: 2008-08-12
接受日期: 2008-08-19 在线出版日期: 2008-10-08

Expressions of CD133 and Ki-67 in gastric carcinoma and their clinicopathologic significances

Ya-Zhuo Li, Feng-Hua Wang, Po Zhao

Ya-Zhuo Li, Po Zhao, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Feng-Hua Wang, Department of Pathology, 208 Hospital of Chinese PLA, Changchun 130062, Jilin Province, China
Correspondence to: Po Zhao, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. zhaopo@301hospital.com.cn
Received: 2008-07-09 Revised: 2008-08-12
Accepted: 2008-08-19 Published online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To investigate the expressions of CD133 and Ki-67 in gastric carcinoma and their clinical significances.

METHODS: Immunohistochemistry (PV6000 method) was used to detect CD133 and Ki-67 expressions in paraffin-embedded gastric carcinoma tissues of 336 cases and paracancerous normal mucosa of 60 cases using tissue array technology. In this study all cases were successfully followed up.

RESULTS: The positive expression rates of CD133 and Ki-67 in gastric carcinoma were 57.4% and 58.3%, respectively. CD133 and Ki-67 were all correlated to tumor size, differentiation degree, infiltrative depth, clinical stage, lymphatic invasion and distant metastasis (all $P < 0.05$). The 5-year survival rate of the patients with CD133 or Ki-67 expression was lower than that of patients with negative expression (both $P < 0.05$). The CD133 expression in gastric carcinoma was positively correlated with the Ki-67 expression ($r = 0.188$, $P < 0.05$). The expressions of CD133 and Ki-67 in carcinoma were significantly higher than those in normal mucosa tissues (57.4% *vs* 28.6%, 58.3% *vs* 18.6%, both $P < 0.05$). CD133 and Ki-67 were both independent prognostic indicators for survival time after operation.

CONCLUSION: CD133 and Ki-67 play significant roles in the generation and evolution of gastric carcinoma and can be used as useful indicators for clinical assessment of tumor biological behavior and prognosis in patients with gastric carcinoma.

Key Words: Gastric neoplasms; Immunohistochemistry; Cancer stem-like cell; CD133; Ki-67

Li YZ, Wang FH, Zhao P. Expressions of CD133 and Ki-67 in gastric carcinoma and their clinicopathologic significances. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3167-3171

摘要

目的: 研究CD133和Ki-67在胃癌中的表达, 并探讨其与肿瘤生物学特征及患者术后生存时间的关系.

方法: 应用组织芯片技术, 采用PV6000二步法检测有完整随访资料的336例胃癌及60例癌旁正常组织中CD133和Ki-67表达的差异.

结果: 胃癌CD133和Ki-67的阳性率为57.4%, 58.3%. CD133和Ki-67的表达均与肿瘤大小、分化程度、浸润深度、淋巴结转移数目、TNM分期和出现腹腔及远处转移相关(均$P<0.05$). CD133和Ki-67阳性组患者的5年生存率均低于阴性组(均$P<0.05$). CD133和Ki-67在胃癌的表达呈正相关($r = 0.188$, $P<0.05$). CD133和Ki-67在胃癌组织中的表达显著高于在癌旁正常组织中的表达(57.4% *vs* 28.6%, 58.3% *vs* 18.6%, 均$P<0.05$). CD133和Ki-67均

■背景资料
胃癌是消化系最常见的恶性肿瘤之一. 目前仅仅依靠某些传统的病理指标来评估患者的预后和选择治疗方法, 并不能充分满足临床的需要. 近年来, 随着对新的生物标志物的深入研究, 使得部分生物标志物在肿瘤的诊断、治疗及预测复发等方面发挥了重要作用.

■同行评议者
陈卫昌, 教授, 苏州大学附属第一医院消化内科

■研发前沿
目前CD133主要用于各种恶性肿瘤癌干细胞的研究，并发现其表达与多种癌干细胞密切相关. 但到目前为止，国内外未见CD133表达与胃癌干细胞相关性的报道，CD133表达与胃癌预后关系的报道亦少见.

是患者术后生存时间的独立预后因子.

结论：CD133和Ki-67在胃癌的发生、发展、转移及预后中发挥重要作用，可考虑作为胃癌临床评价肿瘤生物学行为及评估预后的指标.

关键词：胃肿瘤；免疫组化；癌干样细胞；CD133；Ki-67

李亚卓，王凤华，赵坡. CD133、Ki-67在胃癌的表达及临床病理意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3167-3171
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3167.asp

0 引言

CD133是一种分子质量为120 kDa的跨膜蛋白，最初被认为是造血干细胞标志物，后发现正常非淋巴造血组织中也可检测到CD133 mRNA转录本[1]. 目前CD133主要用于各种恶性肿瘤癌干细胞的研究，但在胃癌中尤其是对预后的影响方面，少见报道. Ki-67是一种公认的与细胞增殖特异性相关的核抗原，主要用于判断细胞增殖活性. 本研究应用免疫组化技术测定胃癌中CD133和Ki-67的表达情况，并探讨他们与临床病理特征及患者预后的可能关系.

1 材料和方法

1.1 材料 构建组织芯片的336例标本均来自中国人民解放军总医院1998-2001年间实施手术切除并有完整随访资料的胃癌病例(已剔除失访病例)，男274例，女62例. 患者均为首次发现胃癌，术前未经过放化疗或免疫治疗；影响学检查均未发现有远隔器官转移. 按照2003年国际抗癌联盟修订的胃癌临床病理TNM分期，Ⅰ期66例，Ⅱ期77例，Ⅲ期147例，Ⅳ期46例；组织学分级，Ⅰ级17例，Ⅱ级65例，Ⅲ级254例；组织学类型，管状腺癌(中高分化腺癌)75例，黏液腺癌32例，低分化腺癌183例，印戒细胞癌35例，其他类型11例. 截至到2008-03，患者平均随访时间为45.4 mo，所有患者中死亡251例，存活85例，最长生存时间为120 mo.

1.2 方法

1.2.1 组织芯片的构建：在336例胃癌和60例癌旁正常组织的石蜡标本上采集组织芯，直径1.0 mm，孔间距1.2 mm，排列成9行×8列共72点微阵列，每2点代表1例患者组织，共制成组织芯片11块.

1.2.2 免疫组化染色：应用免疫组化PV6000二步法进行检测，所采用试剂兔抗人CD133多克隆抗体(北京博奥森)、鼠抗人Ki-67 mAb(美国Zymed)、枸橼酸抗原修复液(pH6.0)、DAB显色液及PBS等均购自北京中杉公司. 每个组织芯片蜡块取4 μm厚连续切片，经脱蜡、高压锅热修复、过氧化氢(H_2O_2)封闭后滴加一抗，CD133(1∶500)，Ki-67(1∶100). 4℃过夜，滴加二抗试剂(Polyperoxidase-anti-mouse/rabbit IgG)，37℃孵育30 min，最后DAB显色、苏木素复染、封片. CD133、Ki-67分别为细胞膜和细胞核表达，阳性细胞≥10%定为阳性.

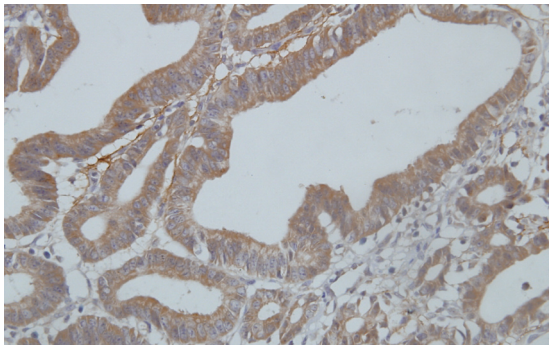


图 1 胞膜CD133阳性(IHC × 400).

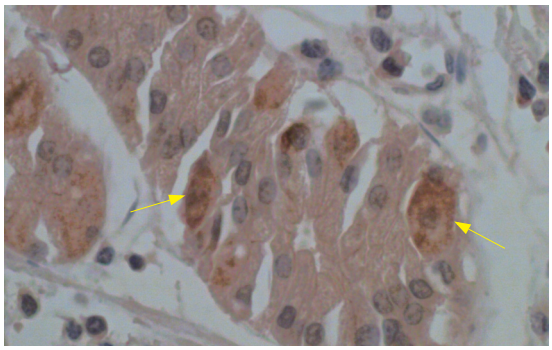


图 2 CD133点染箭头所示(IHC × 400).

统计学处理 SPSS13.0软件对数据处理. CD133和Ki-67在胃癌表达的相关性采用Spearman等级资料相关分析；二者在肿瘤和正常组织中表达的差异以及与临床病理类型中的差异采用χ^2检验；对生存率影响的单因素分析采用Log-rank检验；多因素分析采用Cox比例风险模型. $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 CD133和Ki-67的表达及其与临床病理特征的关系 336例胃癌中CD133阳性193例(图1-2)，阳性率为57.4%. Ki-67阳性196例(图3)，阳性率为58.3%. 随肿瘤增大、分化降低、浸润加深、淋巴结转移数目增多、TNM分期递增，出现腹腔及远处转移CD133和Ki-67的表

表 1 CD133和Ki-67的阳性表达与临床病理特征的关系

临床病理因素	CD133		统计值	Ki-67		统计值
	+	−		+	−	
年龄情况						
$n \leqslant 40$	16	18	$\chi^2 = 1.67$	20	14	$\chi^2 = 2.47$
$40 < n \leqslant 65$	116	82	$P > 0.05$	109	89	$P > 0.05$
$n > 65$	61	43		67	37	
肿瘤大小						
d<4 cm	30	47	$\chi^2 = 22.15$	32	45	$\chi^2 = 15.16$
4 cm≤d<8 cm	117	84	$P < 0.05$	121	80	$P < 0.05$
d≥8 cm	46	12		43	15	
组织学分级						
Ⅰ级	7	10	$\chi^2 = 6.87$	6	11	$\chi^2 = 9.95$
Ⅱ级	30	35	$P < 0.05$	30	35	$P < 0.05$
Ⅲ级	156	98		160	94	
浸润深度						
达黏膜下层	4	19	$\chi^2 = 33.82$	6	17	$\chi^2 = 21.95$
达浆膜下层	47	56	$P < 0.05$	52	51	$P < 0.05$
出浆膜层	122	65		118	69	
邻近器官	20	3		20	3	
淋巴结受累						
LN = 0	43	68	$\chi^2 = 28.16$	44	67	$\chi^2 = 33.51$
LN = 1-6	78	50	$P < 0.05$	77	51	$P < 0.05$
LN = 7-15	52	20		52	20	
LN>15	20	5		23	2	
TNM分期						
Ⅰ期	19	47	$\chi^2 = 41.26$	20	46	$\chi^2 = 41.07$
Ⅱ期	38	39	$P < 0.05$	40	37	$P < 0.05$
Ⅲ期	98	49		96	51	
Ⅳ期	38	8		40	6	
腹腔及远处转移						
无转移	180	140	$\chi^2 = 3.90$	182	138	$\chi^2 = 5.88$
有转移	13	3	$P < 0.05$	14	2	$P < 0.05$
5年生存率						
生存	44	82	$\chi^2 = 41.82$	46	80	$\chi^2 = 39.51$
死亡	149	61	$P < 0.05$	150	60	$P < 0.05$

■相关报道

CD133在肿瘤组织水平上的研究少见, 国外文献报道多从细胞水平进行研究, 并认为他是多种肿瘤干细胞的特异性标志物. CD133在胃癌发生、发展过程中表达的趋势及机制目前仍不清; 大量文献报道Ki-67增殖指数高低与肿瘤的分化程度、浸润转移以及预后密切相关, 在肿瘤中Ki-67与CD133表达的相关性未见报道.

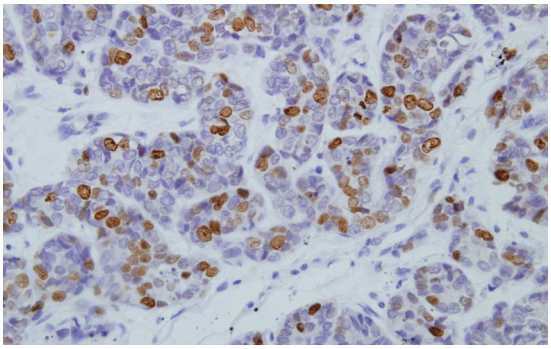


图 3 胞核Ki-67阳性(IHC × 400).

表 2 CD133和Ki-67的表达与预后的关系

标志物	n	平均术后生存时间(mo)	χ^2值	P值
CD133				
+	193	36.3 ± 2.5	54.88	$P < 0.05$
−	143	66.0 ± 3.1		
Ki-67				
+	196	36.7 ± 2.4	58.54	$P < 0.05$
−	140	66.4 ± 3.2		

达逐渐增高($P<0.05$, 表1).

2.2 CD133和Ki-67的表达与患者预后的关系

CD133和Ki-67阳性表达组患者的术后生存时间短于阴性表达组($P<0.05$, 图4). CD133和Ki-67阳性表达组患者的平均术后生存时间分别为36.3

■应用要点
本研究发现，CD133和Ki-67的表达均与肿瘤大小、分化程度、浸润深度、淋巴结转移数目、TNM分期和出现腹腔及远处转移相关；CD133和Ki-67在胃癌的表达呈正相关；CD133和Ki-67均是患者术后生存时间的独立预后因子. 两者联合使用进行免疫组织化学检测，可考虑作为胃癌临床评价肿瘤生物学行为及判断预后的有用指标之一.

表 3 术后生存时间多因素分析结果

变量	回归系数	标准误	χ^2	自由度	*P*值	危险比
年龄	0.475	0.109	18.843	1	0.000	1.608
组织学分级	0.043	0.166	0.067	1	0.796	1.044
组织学类型	0.227	0.078	8.434	1	0.004	1.255
浸润深度	0.206	0.168	1.496	1	0.221	1.229
淋巴结受累	0.240	0.139	2.965	1	0.085	1.271
远处及腹腔转移	0.957	0.314	9.303	1	0.002	2.604
TNM分期	−0.130	0.189	0.474	1	0.491	0.878
肿瘤大小	0.557	0.123	20.433	1	0.000	1.746
CD133	0.589	0.146	16.384	1	0.000	1.802
Ki−67	0.690	0.149	21.427	1	0.000	1.993

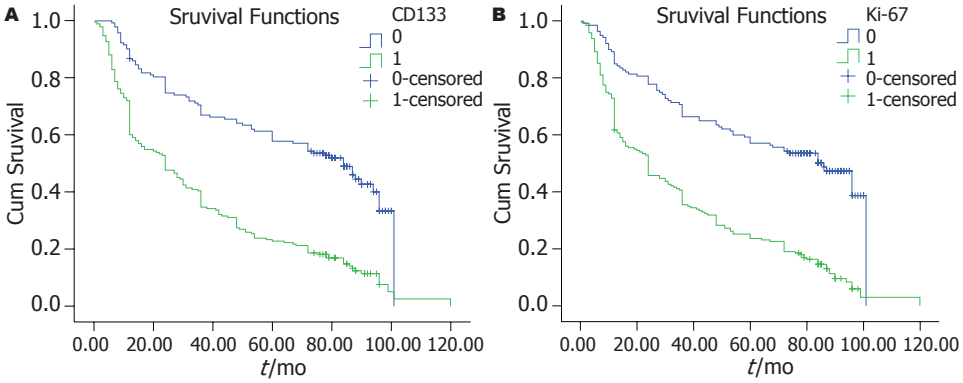


图 4 CD133及Ki−67阳性组和阴性组术后生存曲线. A: CD133; B: Ki−67; 绿色: 阳性组; 蓝色: 阴性组.

mo和36.7 mo, 阴性表达组患者的平均术后生存时间分别为66.0 mo和66.4 mo(表2).

2.3 CD133和Ki-67在胃癌表达的相互关系 CD133、Ki-67在胃癌的表达呈正相关($r = 0.188$, $P = 0.001$).

2.4 CD133和Ki-67在胃癌组织与癌旁正常组织中表达的差异 CD133在胃癌组织中的阳性表达率为57.4%, 在癌旁正常组织中的阳性表达率为28.6%, 二者差异具有统计学意义($P = 0.0001$). Ki-67在胃癌组织中的阳性表达率为58.3%, 在癌旁正常组织中的阳性表达率为18.6%, 二者差异具有统计学意义($P = 0.0001$).

2.5 CD133和Ki-67与患者生存时间的多因素分析 Cox多因素术后生存分析结果显示, CD133、Ki-67、患者年龄、肿瘤大小、组织学类型、腹腔及远处转移是胃癌术后生存时间的独立预后因子, 其中CD133、Ki-67的回归系数为正, 表明他们与患者的术后生存时间呈正相关, 其表达为阳性者, 术后生存时间短(表3).

3 讨论

肿瘤干细胞(tumor stem cell, TSC), 又称癌干细胞, 是指癌组织中一些较少的具有无限自我更新潜能并促使肿瘤形成的细胞, 而CD133是目前用于各种肿瘤干细胞研究的热点标志物之一. CD133较早应用于脑瘤干细胞的研究, 每只小鼠接种100个CD133阳性脑肿瘤干, 结果在接种后6 mo内形成肿瘤; 而每只接种10万个CD133阴性非肿瘤干细胞的小鼠在相同时间内未形成肿瘤[2]. 此外, O'Brien *et al*[3]用流式细胞仪纯化结肠癌组织中的CD133阳性细胞, 并把他移植到小鼠肾被膜下使其形成肿瘤, 结果提示CD133可能为结肠癌干细胞的标志物. 但到目前为止, 国内外未见从人类胃癌组织中分离出胃癌干细胞的报道, 有关CD133与胃癌临床病理特征及预后关系的报道也不多.

本研究显示, 胃癌组织中的CD133阳性细胞越多、分化越差、浸润越深、分期越晚, 淋巴结转移数目越多, 术后生存时间也就越短, 提示肿瘤组织中CD133阳性细胞越多, 含有的癌干样细胞就越多. 术后一些残留的癌干样细胞通过自我更新和多向分化, 导致肿瘤复发和转移. 由此推测CD133可能是胃癌癌干样细胞的特异性

分子标志物. CD133作为一种人类干细胞或祖细胞膜抗原, 可在肿瘤血管内皮祖细胞及间质干细胞中表达, 而成熟血管内皮细胞和间质细胞则不表达CD133[4-5]. 但本研究中观察到少数胃癌间质纤维结缔组织、血管内皮及紧邻癌组织的正常腺上皮细胞也有CD133的点彩状表达, 其确切机制及作用不明. 研究发现, 血管内皮祖细胞的活化可参与肿瘤血管生成[6]; 间质干细胞可调控肿瘤微环境[7], 故推测CD133标识胃癌组织中成熟血管内皮细胞和间质细胞及周围少量正常上皮细胞, 有可能导致这些细胞迅速增殖转化为癌细胞, 但此推断需进一步加以验证.

Ki-67与胃癌关系的研究报道较多, 但结论并不完全一致, Czyzewska *et al*[8]研究证实Ki-67表达与肿瘤的分化程度、Lauren分型、淋巴结转移等明显相关, 与年龄、肿瘤部位无关; Oshima *et al*[9]的研究表明Ki-67表达与年龄、性别、分期和预后等均无明显相关; 国内施俊 *et al*[10]的研究认为Ki-67表达与预后因素无相关性. 本研究中, Ki-67的表达与肿瘤大小、分化程度、浸润深度、淋巴结转移、TNM分期和预后有关, 与Czyzewska *et al*[8]研究一致. 一般认为细胞持续增殖时, 容易形成肿瘤[11]. 本研究中发现Ki-67在胃癌组织中的阳性率显著高于癌旁组织, 提示胃癌组织中细胞增殖比正常组织中旺盛, 与张阳等的研究一致[12]. 由此提示: Ki-67可反映肿瘤细胞的增殖情况, 而胃癌中CD133表达越高, 可能预示着增殖活跃的癌干样细胞越多, 在胃癌术后标本中联合检测Ki-67和CD133的表达, 一定程度上可反映胃癌细胞的生物学行为, 指导化疗方案的选择.

总之, CD133及Ki-67在胃癌的发生、发展及转移中发挥着重要作用, 两者联合使用进行免疫组织化学检测, 可考虑作为胃癌临床评价肿瘤生物学行为及判断预后的有用指标之一.

■同行评价

本文采用组织芯片方法检测了CD133\Ki-67在336例胃癌中表达的临床意义, 病例数较多, 有长期随访的资料, 有一定的科学性和实用性, 具有较好的参考价值.

4 参考文献

1 Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997; 90: 5013-5021

2 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401

3 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

4 Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Gunsilius 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

5 Yu Y, Fuhr J, Boye E, Gyorffy S, Soker S, Atala A, Mulliken JB, Bischoff J. Mesenchymal stem cells and adipogenesis in hemangioma involution. *Stem Cells* 2006; 24: 1605-1612

6 Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 294-300

7 Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 267-274

8 Czyzewska J, Guzińska-Ustymowicz K, Lebelt A, Zalewski B, Kemona A. Evaluation of proliferating markers Ki-67, PCNA in gastric cancers. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004; 49 Suppl 1: 64-66

9 Oshima CT, Iriya K, Forones NM. Ki-67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer. *Neoplasma* 2005; 52: 420-424

10 施俊, 魏品康, 许玲, 何金, 孙大志. 胃癌证型与肿瘤增殖的关系. 世界华人消化杂志 2006; 14: 863-868

11 申漫里, 冯永东, 高纯, 陶德定, 龚建平. 细胞周期蛋白B1在肿瘤细胞中的非时相性表达. 中华肿瘤杂志 2002; 24: 215

12 张阳, 张联, 潘凯枫, 游伟程, 李吉友. 山东省胃癌高发区人群胃黏膜肠化的预后与标记物. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2306-2310

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3172
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

肠黏膜免疫系统调节异常导致炎症性肠病发生

刘占举, 申民强, 任宏宇, 邹开芳, 刘丽娜, 梁丽娜, 白爱平, 黄美兰, 冉志华, 王晓娣, 张德奎, 甘华田, 吴小平, 欧阳春晖

编者按 炎症性肠病(iflammatory bowel disease, IBD)的病因和发病机制尚不清楚, 肠黏膜组织内免疫调节异常、持续的肠道感染、肠黏膜屏障缺损、遗传和环境因素等共同参于疾病发生进程. 尤其是肠黏膜组织内各种淋巴细胞对肠道细菌和食物抗原异常免疫应答, 诱导激活, 表达高水平的辅助信号分子和促炎症细胞因子, 造成黏膜组织炎症损伤. 通过抑制黏膜组织内淋巴细胞激活、炎症介质分泌、细菌抗原的识别, 以及修复黏膜屏障功能等是治疗IBD的重要措施. 本期焦点论坛邀请国内IBD领域中青年专家对这些问题进行了深入讨论.

1 炎症性肠病患者NK细胞激活和效应应答…… 3173
2 炎症性肠病肠黏膜组织内淋巴细胞激活和效应应答…… 3178
3 炎症性肠病与肠黏膜免疫调节细胞…… 3181
4 炎症性肠病肠黏膜屏障损伤机制…… 3187
5 肠道抗原识别与炎症性肠病…… 3192
6 炎症性肠病患者肠黏膜组织细胞凋亡…… 3197
7 重视研究肠道神经系统在炎症性肠病发病中作用…… 3200
8 防御素与炎症性肠病…… 3204

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3173-3177
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

炎症性肠病患者NK细胞激活和效应应答

申民强, 刘占举

申民强, 刘占举, 郑州大学第二附属医院消化内科 河南省郑州市 450014
申民强, 中国人民解放军152医院消化内科 河南省平顶山市 467000
国家自然科学基金资助项目, No. 30571751
通讯作者: 刘占举, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化内科. zhanjuliu@yahoo.com
电话: 0371-63939084 传真: 0371-63934118
收稿日期: 2008-07-19 修回日期: 2008-08-26
接受日期: 2008-09-01 在线出版日期: 2008-10-08

NK cell activation and immune response in inflammatory bowel disease

Min-Qiang Shen, Zhan-Ju Liu

Min-Qiang Shen, Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
Min-Qiang Shen, Department of Gastroenterologey, the 152th Hospital of Chinese PLA, Pingdingshan 467000, Henan Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30571751
Correspondence to: Zhan-Ju Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. zhanjuliu@yahoo.com
Received: 2008-07-19 Revised: 2008-08-26
Accepted: 2008-09-01 Published online: 2008-10-08

Abstract
Inflammatory bowel disease (IBD) is closely associated with the abnormal immune response of intestinal immune system to enterobacteria and dietary antigens. Large amounts of mononuclear lymphocyte infiltrates and high expression levels of proinflammatory cytokines and costimulatory molecules are present in inflamed mucosa. NK cells, involved in innate and acquired immune response, have cytolitic activities through secretion of lytic proteins, and produce proinflammatory mediators. Increased infiltration of NK cells present in inflamed mucosa of IBD expresses high levels of activated molecules and proinflammatory cytokines, and plays a role in intestinal mucosal damage.

Key Words: Inflammatory bowel disease; NK cell; Immune response

Shen MQ, Liu ZJ. NK cell activation and immune response in inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3173-3177

摘要
炎症性肠病与肠道黏膜免疫系统对肠腔内细菌和食物抗原等异常免疫应答有密切关系, 在炎症肠黏膜组织内有大量激活的单个核淋巴细胞浸润, 表达高水平的促炎症细胞因子和辅助刺激信号分子等. NK细胞是先天性和获得性免疫应答的重要淋巴细胞, 主要通过分泌细胞毒杀伤蛋白质对靶细胞进行直接杀伤, 并分泌促炎症介质. 在炎症性肠病患者炎症肠黏膜组织内有大量NK细胞浸润, 表达高水平激活分子, 并分泌促炎症细胞因子, 参与肠黏膜炎症损伤.

关键词: 炎症性肠病; NK细胞; 免疫应答

申民强, 刘占举. 炎症性肠病患者NK细胞激活和效应应答. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3173-3177
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3173.asp

0 引言
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC). 虽然研究发现IBD的发生主要与肠道免疫应答异常有密切关系, 但其病因和发病机制仍不太清楚. 目前, 国内外大多学者认为是由于多因素相互作用所致, 肠壁黏膜免疫调节异常、持续的肠道感染、肠壁黏膜屏障缺损、遗传和环境因素等共同参与疾病发生进程[1-2]. CD主要表现为整个肠壁黏膜组织肉芽肿性炎症, 多发生在回肠末端和升结肠段, 也可发生在口腔、食道、胃和肛门区; 而UC仅限于结肠. 在IBD的肠壁黏膜组织中, 有大量激活的单个核淋巴细胞浸润, 如$CD25^+CD69^+CD4^+$ T、$CD20^+$ B、$CD25^+$ NK细胞、$CD68^+$巨噬细胞和树突状细胞. 这些淋巴细胞表面表达有很高的辅助刺激信号分子, 如$CD40^+ICOS^+RANKL^+$ $4\text{-}1BB^+$的$CD4^+$ T细胞、

■背景资料
虽然研究发现IBD的发生主要与肠道免疫应答异常有密切关系, 但其病因和发病机制仍不太清楚. 目前, 国内外大多学者认为是由于多因素相互作用所致, 肠壁黏膜免疫调节异常、持续的肠道感染、肠壁黏膜屏障缺损、遗传和环境因素等共同参与疾病发生进程.

■同行评议者
潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室; 任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科

■研发前沿
目前有些学者发现CD和UC患者的临床免疫差异在个别病例中也不完全一致，尤其在CD的早期、诱导期和效应期，Th1和Th2两种免疫应答均可出现. 因此，有学者提议使用患者的先天性和后天获得性免疫异常来解释.

$CD40^+CD80^+CD86^+RANK^+$ 4-1BBL$^+$的单核巨噬细胞或树突状细胞，还表达有很高的趋化因子受体(如CCR5、CCR7、CCR9)及促白细胞移动分子(P-selectin、E-selectin、ICAM-1、VCAM-1). CD肠壁黏膜组织中，$CD4^+$ T细胞受到体外信号刺激，产生大量的辅助T细胞(Th)1型促炎症细胞因子，如白介素(IL)-2，干扰素(IFN)-γ，肿瘤坏死因子(TNF)-α等. 近年来，在CD炎症肠壁黏膜内也发现有大量的其他促炎症细胞因子表达、如IL-12、IL-15和IL-18. IL-12主要是抗原递呈细胞(如单核巨噬细胞、树突状细胞)分泌的一种细胞因子，他通过结合T细胞表面的受体(IL-12Rβ1、β2)，激活细胞内Janus酪氨酸激酶2和Tyk2，诱导信号传导因子STAT-4或STAT-3基因转录，从而发挥其生物学效应[3]. IL-12可强烈地刺激T、NK细胞激活、分化、IFN-γ分泌、CD8细胞毒效应(CTL)应答和NK细胞介导的细胞毒效应，他在Th1性免疫应答和细胞介导的免疫反应中起到中心作用. IL-12可直接刺激CD患者外周血和肠壁黏膜组织中$CD4^+$ T细胞激活，并产生大量促炎症细胞因子，提示其与CD发生有密切关系[3]. 研究发现[4]，在IBD患者的炎症肠壁黏膜内有大量IL-15阳性细胞浸润，体外培养发现LPS可刺激IBD患者肠黏膜固有层组织内单个核淋巴细胞分泌IL-15，进而增强和诱导炎症肠壁内T细胞的激活和促炎症细胞因子的分泌. 另外，IL-18也在CD患者的病变肠黏膜中有很高的表达，体外实验证实IL-18可刺激CD患者肠黏膜组织中$CD4^+$ T细胞的激活等[5].

UC患者主要表现为结肠壁浅表黏膜组织炎症，可出现溃疡及急性脓性白细胞浸润. UC患者的临床免疫特征主要表现为Th2 型免疫应答，肠壁黏膜组织中激活的$CD4^+$ T细胞主要分泌IL-4和IL-13[1-2]. 目前有些学者发现CD和UC患者的临床免疫差异在个别病例中也不完全一致，尤其在CD的早期、诱导期和效应期，Th1和Th2两种免疫应答均可出现. 因此，有学者提议使用患者的先天性和后天获得性免疫异常来解释. 正如在CD病变发生时，表现有肠上皮细胞黏膜屏障缺损和通过诱导细菌抗原激活核因子NF-κB的易感基因NOD2/CARD15引起病变[2].

1 NK细胞免疫应答效应

NK细胞是一种来自于骨髓造血细胞，无T和B细胞表面特征，他们的胞质中的含有许多嗜苯胺颗粒样的物质，占外周血总淋巴细胞的10%-15%，他们的细胞表型是$CD3^-CD56^+$，在外周血中以$CD56^{dim}$为主，而在淋巴结中则主要是$CD56^{bright}$，其中90%的外周血NK细胞为$CD56^{dim}CD16$，而10%仅为$CD56^{bright}CD16^-$. 前者主要拥有细胞毒活性，而后者可分泌各种促炎症细胞因子[6-7]. 另外，这两类NK细胞表面趋化因子和黏附分子表达也不同，提示他们向组织内着陆分布有差异[8]. NK细胞与$CD8^+$ CTL细胞一样，通过分泌细胞毒杀伤蛋白质(如perforin, granzymes)对靶细胞进行直接杀伤，同时可分泌促炎症细胞因子(如TNF-α, IFN-γ). NK细胞的功能包括控制病毒和细菌的感染，调节体内环境的稳定，产生细胞因子，对肿瘤细胞的杀伤效应，并建立一个先天性免疫和获得性免疫间的联系[9]. NK细胞无需T细胞表面受体或免疫球蛋白信号而发挥其的细胞毒杀伤功能，其效应应答是通过两个独特的受体系统而发挥作用，其一是通过Ⅰ类HLA分子识别相应抗原而抑制免疫应答；其二是通过非HLA分子来杀伤靶细胞. NK细胞表面结合HLA-I类分子的受体按功能可分为抑制性受体和激活性受体. 前者的胞质内含有免疫受体酪氨酸抑制序列分子，而后者则为胞质内含有免疫受体酪氨酸激活分子. NK细胞的抑制性受体包括对HLA-A、B、C特异的免疫球蛋白样的杀伤抑制性受体(Ig-like killer inhibitory receptor, KIR)、对HLA-E特异的CD94/NKG2A受体和I类MHC分子特异的IL-T2/LIR1受体. KIR基因家族有15个基因和2个假基因，位于19号染色体q13.4点. 这些基因表达在部分NK细胞、$\gamma\delta TCR^+$ T细胞、记忆/效应$\alpha\beta TCR^+$ T细胞，但在未激活的初始型T细胞上无表达[10]. NK细胞的激活性受体包括NKp30、NKp44和NKp46，他们是一族鸦片受体，在抗肿瘤和病毒感染时起着关键作用. 另外，还有一些激活受体，如NKG2D、2B4和NTB-A，他们在NK细胞和部分$CD8^+$ T细胞毒杀伤细胞上也有表达. Perforin、Fas和TNF家族成员如TRAIL在NK细胞的细胞毒效应应答中发挥着重要作用[9-10].

2 NK细胞参与免疫病理

许多机制参与了NK细胞向组织中移动. 体外刺激NK细胞，其表面可表达一系列趋化因子受体如CCR1、CCR2、CCR5、CCR6、CCR7、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR6和CX3CR1等[11]. CX3CR1表达在大部分外周血的效应NK细胞上，他促进NK细胞向炎症部位趋向移动、释放噬苯胺颗粒和杀伤肿瘤细胞[12].

Inngjerdingen *et al*[13]报道, NK细胞在趋化因子CXCL10刺激下, 可向炎症部位和肿瘤组织中移动. 已发现这些趋化因子受体在许多炎症疾病中有较高表达, 如急性肾小球肾炎、风湿性关节炎、病毒性肝炎和冠状动脉粥样病变, 提示NK细胞参与了这些免疫病理.

Granulysin主要是NK细胞分泌的一种细胞毒颗粒和杀菌蛋白质, 他能直接杀伤G^+和G^-细菌、结核杆菌、霉菌和寄生虫[14], 另外还发现他还有杀伤肿瘤细胞和抗病毒感染功能. 在NK细胞激活时, Granulysin分泌显著升高[14]. 已发现在一些疾病中, 如产前子癫、麻风病和肾移植患者, Granulysin分泌有明显升高, 提示NK激活分泌细胞毒效应分子可诱导组织炎症损伤. 已报道, CD40L和CD28分子在NK细胞激活时表达升高, 通过CD40和CD80信号刺激可有效地激活NK细胞, 并产生细胞毒杀伤效应、细胞因子分泌, 诱导靶细胞的损伤[15-16]. 研究发现[17], 在IBD患者炎症肠黏膜内有大量的CD40阳性细胞浸润, CD40信号分子可能对NK细胞的效应应答有辅助作用. 文献也报道DC可直接激活NK细胞, 上调NK细胞的细胞毒杀伤活性, 并产生大量的细胞因子[18]. 血小板因子-4可诱导人NK细胞激活, 并产生趋化因子IL-8. IL-8是趋化因子CXC家族的一员, 他可直接诱导中性粒细胞向炎症部位移动, 引起组织损伤. 现已发现血小板因子-4在IBD患者血清中显著升高[19]. 因此, 在IBD患者血清中升高的血小板因子-4很可能刺激NK细胞向炎症性肠壁内移动, 诱导NK细胞激活, 促使肠壁黏膜炎症损伤.

IL-15对NK细胞的生长发育起到关键调节作用, IL-15或IL-15R基因缺陷小鼠内NK细胞的数目显著降低[20]. 我们既往研究报道[4], IBD患者的炎症肠壁黏膜内有大量IL-15阳性的单核巨噬细胞/DC浸润, 体外培养发现, 细菌脂多糖LPS可明显刺激IBD患者炎症肠壁黏膜内单核淋巴细胞分泌IL-15. 研究报道[21], IL-15可以诱导NK细胞向$CD56^{bright}$亚群分化, 增强其细胞毒杀伤能力. IL-21功能与IL-2和IL-15非常相似, 而IL-21R与IL-2Rβ链和IL-4Rα链结构接近, IL-21R与IL-2、IL-4、IL-7、IL-9和IL-15受体共同使用γ链[22]. 目前, IL-21的生物学功能还不十分清楚. 已研究发现IL-21可以协同IL-15和Flt3-L刺激来自于骨髓中的NK细胞分化及成熟. 在IL-21R基因缺陷小鼠内, 各种淋巴细胞成分和NK细胞均正常. 然而, 在其受体γ链基因缺陷小鼠内NK细胞数目比IL-15Rα链基因缺陷型小鼠缺少更明显, 提示IL-21可以协助IL-15刺激NK细胞发育生长. 近年来研究发现, IL-21在IBD患者炎症肠黏膜组织内表达升高[23-24], 我们的研究发现IL-21体外可以刺激IBD患者NK细胞激活, 增强NK细胞的细胞毒杀伤活性, 并分泌大量促炎症细胞因子(如TNF-α、IFN-γ)[25].

文献报道, 在风湿性关节炎患者的关节滑膜中有大量激活的$CD69^+CD56^{bright}$ NK细胞浸润[26], 体外刺激这些NK细胞, 发现他们可分泌大量的IFN-γ, 这些NK细胞可进一步激活单核细胞产生TNF-α. 这些实验数据证实了NK细胞在风湿性关节炎中起到重要作用, 直接参与慢性关节炎症损伤. 在银屑病的皮肤病灶内也发现有大量的$CD16^+$、$CD57^+$、$CD94^+$和$CD158a^+$ NK细胞, 这些细胞主要集中在邻近表皮和真皮界面的乳头样表皮处[27]. 提示NK细胞在银屑病皮肤病变中可能调节局部组织损伤和Th1免疫应答.

■相关报道
研究发现, 在IBD患者的炎症肠壁黏膜内有大量IL-15阳性细胞浸润, 体外培养发现LPS可刺激IBD患者肠黏膜固有层组织内单个核淋巴细胞分泌IL-15, 进而增强和诱导炎症肠壁内T细胞的激活和促炎症细胞因子的分泌.

3 NK在IBD免疫调节作用

胃肠道是机体内部独特的器官组织, 每天有大量的食物抗原、细菌和病毒通过, 并经过肠上皮进行吸收. 在肠黏膜组织固有层内分布着大量的T、B、NK细胞、单核巨噬细胞/树突状细胞.在正常情况下, 这些淋巴细胞处于非常稳定的微环境中, 且不被肠道抗原免疫激活产生特异的免疫反应, 即免疫耐受状态(immune tolerance). NK细胞在胃肠道免疫调节和内环境稳定方面功能仍不清楚, Todd *et al*[28]发现在大鼠肠上皮细胞间淋巴细胞(intraepithelial lymphocyte, IEL)内存在有大量的与脾脏内NK细胞不一样的$\alpha\beta^-\gamma\delta^-TCR^-NKR^-P1A^+$ NK细胞, 这些细胞表面表达相当高的T细胞免疫调节分子, 如ADP核糖转化酶(ribosyltransferase)-2和CD25, 这些细胞可自主性分泌IFN-γ和IL-4. 在健康人肠道黏膜IEL部位也发现了有NK细胞, 当受到肠腔内细菌抗原刺激后分泌促炎症细胞因子(如TNF-α、IFN-γ、IL-2)[29]. 这些结果提示IEL内的NK细胞可直接接受肠腔内细菌抗原的刺激, 参与肠道黏膜的免疫效应应答. Fort *et al*[30]将IL-$10^{-/-}CD4^+$ T细胞通过静脉移植入NK细胞缺失的$RAG^{-/-}$小鼠内, 发现此小鼠可引起慢性结肠炎症, 且临床表现比NK细胞正常性小鼠引起的结肠炎症严重, 提示NK细胞可以调节(或下调)Th1介导的慢性结肠炎症. 目前, 国内外同行对NK细

■同行评价
本文立题依据充分，研究目的明确，重点突出，文字简练，观点新颖，对IBD发病与NK细胞的关系提供了理论依据.

胞在IBD方面的研究报道甚少，在IBD患者的外周血和肠黏膜组织内NK细胞含量增加，利用标准的K562细胞株作为NK细胞的杀伤性靶细胞，发现NK细胞的细胞毒杀伤活性降低[31]. 然而，也有报道在IBD患者NK细胞的细胞毒活性增高，当患者接受皮质激素药物(如Budesonide、Prednisolone)后可显著地抑制NK细胞的活性. 也有学者报道在急性UC患者炎症肠黏膜组织内NK细胞表面受体CD94表达比健康对照明显增加[32]. 近期有研究报道[33]，肠黏膜组织内c-kit$^+$细胞可以在固有层黏膜内分化为NK细胞，CD患者肠黏膜固有层组织内NK细胞数目增多，且NK细胞分化活性增强，提示NK细胞参与了肠道黏膜炎症损伤过程. 近年来，我们也发现IBD患者的炎症肠黏膜组织内有较多的NK和NKT细胞分布，且NK细胞比正常肠黏膜内的NK细胞表达较高的免疫激活分子、如CD25、CD28和CD69[25]. 体外培养发现，IL-21可以诱导IBD患者外周血NK细胞激活，分泌大量促炎症细胞因子，增强IBD患者NK细胞的细胞毒杀伤活性. 尽管近年来对IBD患者的NK细胞效应有一定的研究，然而其在IBD发生过程和对肠黏膜免疫系统的免疫调节作用仍然不明确，需要进一步深入研究.

4 参考文献

1 Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008; 134: 577-594
2 Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434
3 Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 133-146
4 Liu Z, Geboes K, Colpaert S, D'Haens GR, Rutgeerts P, Ceuppens JL. IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J Immunol* 2000; 164: 3608-3615
5 Kanai T, Watanabe M, Okazawa A, Nakamaru K, Okamoto M, Naganuma M, Ishii H, Ikeda M, Kurimoto M, Hibi T. Interleukin 18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 1514-1523
6 Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56 (bright) subset. *Blood* 2001; 97: 3146-3151
7 Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora KW, Schmidt RE. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 3121-3127
8 Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, Wu L, Butcher EC. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* 2001; 166: 6477-6482
9 Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 413-425
10 Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 225-274
11 French AR, Yokoyama WM. Natural killer cells and viral infections. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 45-51
12 Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997; 91: 521-530
13 Inngjerdingen M, Rolstad B, Ryan JC. Activating and inhibitory Ly49 receptors modulate NK cell chemotaxis to CXC chemokine ligand (CXCL) 10 and CXCL12. *J Immunol* 2003; 171: 2889-2895
14 Peña SV, Krensky AM. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol* 1997; 9: 117-125
15 Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, Spits H, Kärre K, Zappacosta S. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med* 1997; 185: 2053-2060
16 Martín-Fontecha A, Assarsson E, Carbone E, Kärre K, Ljunggren HG. Triggering of murine NK cells by CD40 and CD86 (B7-2). *J Immunol* 1999; 162: 5910-5916
17 Liu Z, Colpaert S, D'Haens GR, Kasran A, de Boer M, Rutgeerts P, Geboes K, Ceuppens JL. Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production. *J Immunol* 1999; 163: 4049-4057
18 Amakata Y, Fujiyama Y, Andoh A, Hodohara K, Bamba T. Mechanism of NK cell activation induced by coculture with dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Clin Exp Immunol* 2001; 124: 214-222
19 Vrij AA, Rijken J, Van Wersch JW, Stockbrügger RW. Platelet factor 4 and beta-thromboglobulin in inflammatory bowel disease and giant cell arteritis. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 188-194
20 Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97: 14-32
21 Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, Stewart CC, Caligiuri MA, Evans SS. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* 1998; 161: 400-408
22 Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D, Presnell SR, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant FJ, Lofton-Day C, Gilbert T, Rayond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly RD, Foster D. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of

lymphocyte function. *Nature* 2000; 408: 57-63
23 Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, Caruso R, Tersigni R, Alessandroni L, Biancone L, Naccari GC, MacDonald TT, Pallone F. Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 687-694
24 Caruso R, Fina D, Peluso I, Stolfi C, Fantini MC, Gioia V, Caprioli F, Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Macdonald TT, Pallone F, Monteleone G. A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3alpha, by gut epithelial cells. *Gastroenterology* 2007; 132: 166-175
25 Liu Z, Jiu J. IL-21 receptor signaling enhances NK cell cytolytic activity and induces proinflammatory cytokine production in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008; 134 Suppl 1: A645
26 Dalbeth N, Gundle R, Davies RJ, Lee YC, McMichael AJ, Callan MF. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* 2004; 173: 6418-6426
27 Cameron AL, Kirby B, Fei W, Griffiths CE. Natural killer and natural killer-T cells in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 2002; 294: 363-369
28 Todd DJ, Greiner DL, Rossini AA, Mordes JP, Bortell R. An atypical population of NK cells that spontaneously secrete IFN-gamma and IL-4 is present in the intraepithelial lymphoid compartment of the rat. *J Immunol* 2001; 167: 3600-3609
29 León F, Roldán E, Sanchez L, Camarero C, Bootello A, Roy G. Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes. *Gastroenterology* 2003; 125: 345-356
30 Fort MM, Leach MW, Rennick DM. A role for NK cells as regulators of CD4+ T cells in a transfer model of colitis. *J Immunol* 1998; 161: 3256-3261
31 Giacomelli R, Passacantando A, Frieri G, Parzanese I, D'Alò S, Vernia P, Pimpo MT, Petrucci C, Caprilli R, Cifone MG, Tonietti G. Circulating soluble factor-inhibiting natural killer (NK) activity of fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from inflammatory bowel disease (IBD) patients. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 72-77
32 del Mar Cabrera M, Valle J, Pajares JM, Romero I, Zomeño M, Maté J. Expression of the Kp43 (CD 94) receptor by natural killer (NK) cells in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1316-1320
33 Chinen H, Matsuoka K, Sato T, Kamada N, Okamoto S, Hisamatsu T, Kobayashi T, Hasegawa H, Sugita A, Kinjo F, Fujita J, Hibi T. Lamina propria c-kit+ immune precursors reside in human adult intestine and differentiate into natural killer cells. *Gastroenterology* 2007; 133: 559-573

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 2008-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3178-3180
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

炎症性肠病肠黏膜组织内淋巴细胞激活和效应应答

任宏宇, 邹开芳

■背景资料
肠黏膜组织内淋巴细胞的异常激活, 导致对正常肠黏膜组织的损伤免疫应答, 是炎症性肠病(IBD)发生的关键病理特征.

任宏宇, 邹开芳, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
作者贡献分布: 本文由任宏宇执笔写作, 邹开芳审阅.
通讯作者: 邹开芳, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科.
zkf@medmail.com.cn
电话: 027-85726381
收稿日期: 2008-07-19 修回日期: 2008-09-01
接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-08

Intestinal mucosal lymphocyte activation and effective response in inflammatory bowel disease

Hong-Yu Ren, Kai-Fang Zou

Hong-Yu Ren, Kai-Fang Zou, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical Colleage, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Kai-Fang Zou, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical Colleage, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Road, Wuhan 430022, Hubei Province, China. zkf@medmail.com.cn
Received: 2008-07-19 Revised: 2008-09-01
Accepted: 2008-09-08 Pubilshed online: 2008-10-08

Abstract
Gut mucosal lymphocytes are actived abnormally in inflammatory bowel disease (IBD), characterized by harmful immune responses in normal gut mucosa. In gut mucosal immune response, lamina propria is a major effective site, and intraepithelial lymphocytes and lamina propria lymphocytes play important roles, secreting antibodies and lymphocyte factors. B and T lymphocyte activation and effective response are different according to various antigens. B lymphocytes produce antibodies harmful to mucosa, while T lymphocytes (Th1 and Th17) appear to be over-reacted. Mover, regulatory T lymphocyte defection is also a problem. In this paper, we give comprehensive evaluation on the above points.

Key Words: Inflammatory bowel diseases; Lymphocytes; Effective response

Ren HY, Zou KF. Intestinal mucosal lymphocyte activation and effective response in inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3178-3180

摘要
肠黏膜淋巴细胞的异常激活, 导致对正常肠黏膜组织的损伤免疫应答, 是炎症性肠病(IBD)发生的关键病理特征. 在IBD肠道黏膜免疫反应中, 固有层成为黏膜免疫应答的主要效应场所, 上皮内淋巴细胞和固有层淋巴细胞发挥着重要作用, 分泌淋巴细胞因子和产生免疫球蛋白. 针对不同抗原, B、T淋巴细胞的激活和效应应答各异, B淋巴细胞产生多种损伤性抗体, T淋巴细胞有Th1和Th17淋巴细胞的过度反应、调节性T淋巴细胞的缺陷等, 本文在此进行了相关的综合评价.

关键词: 炎症性肠病; 淋巴细胞; 效应应答

任宏宇, 邹开芳. 炎症性肠病肠黏膜组织内淋巴细胞激活和效应应答. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3178-3180
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3178.asp

0 引言
肠黏膜免疫系统由弥漫分布于肠黏膜上皮内和固有层的免疫细胞、免疫分子及潘氏结(peyer's patches, PP结)等肠黏膜相关性淋巴组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)组成. GALT包括上皮内淋巴细胞(intraepithelial lymphocytes, IELs)和固有层淋巴细胞(lamina propria lymphocytes, LPLs), 功能上分为B、T淋巴细胞, 分别具有体液免疫和细胞免疫的作用, 主要在PP结经肠内细菌抗原和非细菌抗原诱导激活, 分化、成熟后, 移行到肠黏膜上皮和固有层这些效应部位, 成为IELs、LPLs, 产生免疫效应应答. 肠黏膜组织内淋巴细胞的异常激活, 导致对正常肠黏膜组织的损伤免疫应答, 是炎症性肠病(IBD)发生的关键病理特征[1]. 目前对参与IBD异常免疫的肠黏膜淋巴细胞如何激活和应答的认识正不断充实, 将有助于最终掌握IBD的发生机制, 为诊断和治疗提供新策略.

■同行评议者
潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室; 任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科

发生IBD时, 肠黏膜的天然免疫和特异性免疫系统均有免疫异常的表现, 而淋巴细胞参与的IBD异常免疫主要为特异性(适应性)免疫反应. 现在认为, 肠黏膜免疫系统对肠腔常驻菌群的不耐受, 是IBD发病机制的中心环节[2].

1 IEL和LPL在IBD肠道黏膜免疫反应中的作用

1.1 IEL IEL位于黏膜上皮细胞的细胞间隙, 占肠上皮细胞数量的6%-40%, IEL中90%以上为CD3+T细胞, <6%为sIg^+B细胞. T细胞由起源不同的两种亚群组成, 一是胸腺依赖性IEL, 约占40%, 为CD^+、TCRαβ型T细胞, 多表达Thy、CD4、CD5、CD8αβ. IEL的前体细胞存在于胸腺中, 分化后移行至Peyer结, 在肠道内抗原的刺激下生长成熟. 二是胸腺非依赖性IEL, 约占60%, 为$CD3^+$、$CD5^-$、TCRαβ或γδT细胞, 表达独特的CD8αα分子, 可能直接由骨髓迁移至肠上皮, 未经胸腺阴性选择, 具有潜在自身反应性的细胞克隆. IEL有与细胞毒T细胞及NK细胞相似的胞内颗粒, 如穿孔素、颗粒酶和丝氨酸酯酶, 可分泌淋巴细胞因子如TNF-α、IFN-γ、IL-2, 具有细胞杀伤作用, 杀死细菌、清除被感染的上皮细胞.

1.2 LPL LPL位于黏膜固有层, T、B细胞均较丰富. LPL以$CD4^+$T细胞占优势, $CD8^+$T细胞较少, 30%以上的$CD8^+$T细胞是CD8αα. γδT细胞明显比上皮内少, 仅占2%. $CD4^+CD8^+$T细胞明显比上皮多, 占14%. B细胞以IgA分泌细胞为主. 固有层的$CD4^+$Th2细胞可分泌多种细胞因子如TGF-β、IL-4、IL-5、IL-6及IL-10, 黏膜固有层免疫应答以Th2型为主[3]. IL-4可激活静止期B细胞, 诱导局部及全身抗体应答; 在IL-6缺陷(Knockout)小鼠, 肠道IgA浆细胞明显减少, 提供外源IL-6后, IgA应答得到恢复, 说明IL-6在促进肠道IgA应答方面起着重要作用[4]. IL-4、IL-5、IL-6可协同诱导$SIgA^+$ B细胞分化成为IgA^+浆细胞. 浆细胞分泌产生的大量IgA通过分泌片的介导进入黏膜, 中和抗原物质, 清除外来抗原, 保护机体, 使固有层成为黏膜免疫应答的主要效应场所.

克罗恩病患者LPL的T细胞研究发现, IL-4、IL-5及IL-2表达均有所下降, IFN-γ比对照组有明显的增加, 特别是通过CD2/CD28的途径, IFN-γ的表达更为明显, 认为是与分泌IFN-γ的T细胞比例增高有关. 溃疡性结肠炎的LPL T细胞则IL-5表达增高, 而IL-4、IL-2和IFN-γ的表达仍属正常. 这两种主要IBD的免疫病理过程, 是因所产生的炎症细胞因子类型的不同, 而具有不同的炎症过程, 其免疫反应不同的原因可能是肠黏膜所接触的抗原各异所致.

2 IBD肠黏膜B、T淋巴细胞的激活和效应应答

2.1 B淋巴细胞 一般认为骨髓的多潜能干细胞转化成细胞表面具有IgM和IgD标记的成熟B淋巴细胞后, 进入黏膜层或黏膜下层的散在淋巴滤泡或PP结的生发中心. 肠腔内抗原通过靠腔面的膜细胞(membrane cell, M细胞)进入黏膜固有层, 经巨噬细胞和树突状细胞的抗原加工后传递至生发中心, 在转化生长因子β(transforming growth factor-β, TGF-β)、IL-4、IL-5、IFN-γ和抗原刺激下, B淋巴细胞增殖并转移, 生成细胞表面含IgG、IgA、IgE等特异性B淋巴母细胞, 一部分直接分散在固有层, 大部分经淋巴细胞再循环返回胃肠道黏膜, 在IL-2和IL-6刺激下转化成抗体产生细胞, 分泌特异抗体, 发挥体液免疫反应. 肠道黏膜中的各种抗体多由局部抗体产生细胞所分泌. 已有动物模型和人IBD的研究发现, 一些细菌抗原和非细菌抗原能激活B淋巴细胞产生抗体, 具有促炎作用[5-6]. 在IBD患者的血清中, 检测出多种抗结肠细胞的抗体, 溃疡性结肠炎(UC)的检出率高于克罗恩病(CD), 这些抗体可与Caco-2、HT-29和LS-180细胞株发生反应. 一般认为, 常见于70%UC患者的核周抗中性粒细胞质抗体(perinuclear antineutrophilic cytoplasmic antibody, pANCA)是非细菌抗体, 而厌氧菌蛋白可与其发生交叉反应. 逐渐发现更多B淋巴细胞应答微生物刺激产生的抗体, 包括抗酒酵母抗体(anti-Saccharomyces cerevisiae, ASCA)、anti-I2[7]、anti-OmpC(outer membrane protein complexes)[8]和抗鞭毛抗体CBir1(anti-flagellin antibody CBir1)[9]. >50%的CD患者有ASCA、anti-OmpC和抗鞭毛抗体CBir1这3种抗体, 78%的患者有其中一种抗体, 57%的有两种, 3种抗体均存在的占26%.

2.2 T淋巴细胞 在IBD患者已经发现了多种T淋巴细胞的免疫功能异常, 如效应T细胞Th1、Th2和Th17淋巴细胞的过度反应[10]、调节性T淋巴细胞的缺陷[11-13]等. 小鼠的IBD模型表现出促炎反应过度和抗炎反应缺陷. 三硝基苯磺酸(2, 4, 6-trinitrobenzene sulfolnic acid, TNBs)诱发TNBs-结肠炎模型, 产生类似于人克罗恩病的病理改变, Th1细胞活化, 产生大量IFN-γ和IL-12, 而IL-4的表达则有所下降. 如给予模型动物抗IL-12和/或抗IFN-γ的抗体, 则可中止所发生的结肠炎, 抗

■研发前沿
对参与IBD异常免疫的肠黏膜淋巴细胞如何激活和应答的认识, 将有助于最终掌握IBD的发生机制, 为临床和实验研究的重点.

■同行评价
本文内容较重要，在提供炎症性肠病肠黏膜组织内淋巴细胞激活和效应应答的信息方面具有一定新颖性，为目前研究热点之一.

IL-12抗体还可减轻模型鼠结肠炎的病情. 认为是具有抗原性的TNBs诱发Th-1细胞产生IFN-γ而活化巨噬细胞(Mϕ), 产生炎症和趋化因子: TNF-α、IL-1、IL-6和IL-8, 出现肠道炎症病变. Th2过度反应的结肠炎模型为唑酮(oxazolone)所诱导, 导致IL-4和IL-13过量产生, 病变类似于溃疡性结肠炎. 若机体调节拮抗Th1细胞功能的Th2细胞的比例, 使其分泌适当的免疫抑制因子TGF-β, 则可缓解或中止炎症. 在溃疡性结肠炎, T细胞反应除了主要表现Th2过度反应外, NK-T细胞也参与了炎症产生的介导[14], 从溃疡性结肠炎组织分离的固有层淋巴细胞, 分泌大量的Th2细胞因子IL-4和IL-13, 这些细胞又具有NK细胞的特有标志CD161, 可识别CD1d, 说明这些细胞就是NK-T细胞, 他能产生IL-13和具上皮细胞毒性. 传统上认为肠黏膜炎症在于Th1/Th2两亚群间的关系, 其相关的细胞因子IFN-γ、IL-4与TGF-β的平衡失调是肠黏膜特发性(Idiopathic)炎性发生发展的关键. 事实上, IBD特异性(适应性)免疫异常反应相当复杂, 并非仅仅Th1/Th2两亚群的变化. 多个动物实验的研究发现, 克罗恩病可见Th17细胞的过度反应, 回肠细菌定植能刺激树突状细胞表达IL-23, 通过IL-23/IL-17免疫轴激活Th17淋巴细胞[10], 患者肠黏膜组织内出现IL-23和IL-17的表达增高. 调节性T淋巴细胞为具抗炎作用的T辅助细胞, 其活化缺陷会导致慢性肠道炎症的发展[14].

3 结论

尽管目前的研究已认识到IBD的根本机制问题为B、T淋巴细胞异常免疫反应, 但尚未能有充分的依据证明这些异常免疫反应是IBD原发的或IBD发生后继发的? 而且并非所有IBD患者均表现有与动物模型相同的异常免疫反应, 那么在人IBD发生中, 仍然需要进一步的实验研究资料, 发现到底有哪些更为IBD特异的抗体? IBD发生发展各阶段过程中, T细胞各亚群间相互消长的动态关系? 这些问题都将成为未来探讨的方向.

4 参考文献

1 Torres MI, Rios A. Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1972-1980

2 Brown SJ, Mayer L. The immune response in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2058-2069

3 Kobayashi T, Okamoto S, Iwakami Y, Nakazawa A, Hisamatsu T, Chinen H, Kamada N, Imai T, Goto H, Hibi T. Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 837-846

4 Husband AJ, Kramer DR, Bao S, Sutherland RM, Beagley KW. Regulation of mucosal IgA responses in vivo: cytokines and adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 54: 179-186

5 Olson TS, Bamias G, Naganuma M, Rivera-Nieves J, Burcin TL, Ross W, Morris MA, Pizarro TT, Ernst PB, Cominelli F, Ley K. Expanded B cell population blocks regulatory T cells and exacerbates ileitis in a murine model of Crohn disease. *J Clin Invest* 2004; 114: 389-398

6 Kawamura T, Kanai T, Dohi T, Uraushihara K, Totsuka T, Iiyama R, Taneda C, Yamazaki M, Nakamura T, Higuchi T, Aiba Y, Tsubata T, Watanabe M. Ectopic CD40 ligand expression on B cells triggers intestinal inflammation. *J Immunol* 2004; 172: 6388-6397

7 Sutton CL, Kim J, Yamane A, Dalwadi H, Wei B, Landers C, Targan SR, Braun J. Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2000; 119: 23-31

8 Cohavy O, Bruckner D, Gordon LK, Misra R, Wei B, Eggena ME, Targan SR, Braun J. Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. *Infect Immun* 2000; 68: 1542-1548

9 Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M, Hershberg RM. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 1296-1306

10 Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006; 116: 1218-1222

11 Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-533

12 Ma X, Torbenson M, Hamad AR, Soloski MJ, Li Z. High-fat diet modulates non-CD1d-restricted natural killer T cells and regulatory T cells in mouse colon and exacerbates experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 130-138

13 Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640

14 Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3181-3186
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

炎症性肠病与肠黏膜免疫调节细胞

刘丽娜, 梁丽娜

刘丽娜, 梁丽娜, 大连医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省大连市 116011
通讯作者: 刘丽娜, 116011, 辽宁省大连市中山路222号, 大连医科大学附属第一医院消化内科. liulina_dl@sohu.com
电话: 0411-83635963-2171
收稿日期: 2008-07-19 修回日期: 2008-08-31
接受日期: 2008-09-01 在线出版日期: 2008-10-08

Relationship between inflammatory bowel disease and immuno-regulatory cells in intestinal mucosa

Li-Na Liu, Li-Na Liang

Li-Na Liu, Li-Na Liang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalin 116011, Liaoning Province, China
Correspondence to: Li-Na Liu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, 222 Zhongshan Road, Dalin 116011, Liaoning Province, China. liulina_dl@sohu.com
Received: 2008-07-19 Revised: 2008-08-31
Accepted: 2008-09-01 Published online: 2008-10-08

Abstract
Inflammatory bowel disease (IBD) includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Although the precise etiopathogenesis of IBD remains unclear, dysfunctions of the immune system has been seen as an important factor. Participation of immuno-regulatory cells and multiple cytokines in immunoreactions and inflammatory process has nowadays become one of the hot spots in research into the immunopathogenesis of IBD. This paper reviewed the function of immuno-regulatory cells in IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Immunoregulatory cells; Cytokines

Liu LN, Liang LN. Relationship between inflammatory bowel disease and immuno-regulatory cells in intestinal mucosa. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3181-3186

摘要
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC). 其病因和发病机制尚未完全明确, 免疫功能紊乱被认为是一重要因素, 肠黏膜免疫调节细胞和多种细胞因子参与免疫反应和炎症过程, 是当前关于IBD免疫发病机制的研究热点之一. 本文仅此作一简要综述.

关键词: 炎症性肠病; 免疫调节细胞; 细胞因子

刘丽娜, 梁丽娜. 炎症性肠病与肠黏膜免疫调节细胞. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3181-3186
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3181.asp

0 引言
近年来, 随着细胞学和分子生物学技术的应用, 对炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)发病机制探讨日渐深入, 研究表明IBD是遗传、环境和黏膜免疫三方面因素作用的结果, 其中免疫功能紊乱是IBD发病的关键因素之一, 而肠黏膜免疫调节细胞贯穿免疫全过程. 本文就免疫调节细胞功能在IBD中的作用作一简述.

1 T细胞与IBD
1.1 Th1/Th2细胞 胃肠道T淋巴细胞分布于上皮层、固有层、黏膜集合或散在的淋巴滤泡及肠系膜淋巴结内. 根据其在发育过程中细胞表面分化的抗原不同, 较早将其分为$CD4^+$ T细胞和$CD8^+$ T细胞亚群; 根据功能差异$CD4^+$ T细胞又分为辅助性T细胞(Th细胞)和抑制性T细胞(Ts细胞). Th细胞主要表现为增强免疫反应, Ts细胞则相反.

1986年Mosmann *et al*[1]首先根据$CD4^+$ T细胞分泌细胞因子和生物功能的不同, 将Th细胞分为Th1和Th2两大类. Th1细胞以表达IL-12和IFN-γ为主, 介导细胞免疫; Th2细胞以表达IL-4、IL-5、IL-10为主, 介导体液免疫反应. Th1和Th2细胞之间相互作用调节着机体免疫平衡, 维持机体内环境的相对稳定. Th1/Th2亚群的免疫失衡与自身免疫性疾病、多种炎症疾病有关, 不少研究报道Th1/Th2亚群失衡可能是IBD的重要发病机制之一.

■背景资料
近年来, 随着细胞学和分子生物学技术的应用, 对炎症性肠病(IBD)发病机制探讨日渐深入, 研究表明IBD是遗传、环境和黏膜免疫三方面因素作用的结果, 其中免疫功能紊乱是IBD发病的关键因素之一, 而肠黏膜免疫调节细胞贯穿免疫全过程.

■同行评议者
潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室; 任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科

■研发前沿
免疫调节细胞及相关细胞因子在IBD的发病机制中的作用尚不十分清楚, 但各种免疫调节细胞及相关细胞因子间相互作用, 形成一个不可分割的网络, 共同促进了IBD的形成和发展.

研究发现, IL-12(p35-p40)和IL-4是两个分别控制着Th1和Th2极化的中枢性细胞因子. 这两种细胞因子诱导各自T细胞亚群的产生, 同时抑制相反亚群的产生. 克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者肠道黏膜组织中IL-12和IFN-γ的表达明显增高, IL-12受体亚型也有较高表达, 而IL-4、IL-5未见增高. 分离并培养IBD患者的肠黏膜固有层单个核细胞, 以IL-12和抗人CD3 mAb刺激, 发现IL-12可显著诱导T细胞的激活并产生大量的促炎症细胞因子[2]. 也有研究表明IL-12可诱导T细胞和NK细胞分泌IFN-γ, 通过STAT4(signal transducer and activator of transcription 4)途径来诱导Th1反应. 删除IL-12p40或IL-12Rb2的小鼠模型则不能诱导Th1应答[3]. 因此认为CD是由IL-12启动, T淋巴细胞分化为Th1细胞介导的炎症反应. 新近Holland *et al*[4]研究发现儿童CD患者发病早期血浆Th1细胞因子水平较正常对照组低, 与其他临床相关参数具有正相关性, 同时观察到Th1细胞因子表达水平具有年龄依赖的相关性, 分析CD的发病机制可能在不同人群有所不同. 关于溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)目前尚不十分清楚, 但UC患者体内通常可产生多种自身抗体且抗体多为IgG1和IgG4型. van der Veen[5]报道UC患者的肠黏膜IL-5、IL-13显著升高, 后续的研究发现IL-13与IL-4共用一个受体[6], 二者在结构和功能有许多共同之处, 在肠道炎症反应中具有重要作用. IL-4是通过STAT6途径上调GATA3的表达, 促进黏膜T细胞分泌Th2细胞因子, 而删除了IL-4及其受体的鼠模型则不能诱导Th2应答[3], 故UC可能与Th2细胞反应关系密切. 但近期Pang *et al*[7]发现UC患者的外周血和肠黏膜IL-12/STAT4水平升高, 这是第1次在我国UC患者的肠黏膜组织中发现IL-12/STAT4升高, 可能在某种程度上, UC和CD在肠黏膜炎症方面有部分共同的致病机制. Th1/Th2失衡在IBD的发病机制中具有重要作用, 调节Th1/Th2失衡将成为治疗的一个新思路.

1.2 调节性T细胞(regulatory T cell, Treg) 目前还发现一类有别于Th1/Th2的特殊细胞, 具有调节功能的T细胞群体-Treg, 根据表面标志物、分泌的细胞因子及作用机制的不同, 可分为不同的亚型. 目前对这类细胞研究较多的一类亚型是$CD4^+CD25^+$ Treg细胞, 可从人的胸腺和外周血中分离到, 其主要作用是抑制自身反应性T细胞以维持自身免疫平衡. 如果$CD4^+CD25^+$ Treg细胞数量减少、功能异常或抑制功能受损, 均可导致肠黏膜损伤, 从而诱发IBD的发生. Maul *et al*[8]报道, 应用流式细胞术和RT-PCR法检测分析IBD患者外周血中$CD4^+CD25^+$ Treg和Foxp3的表达水平, 结果发现, IBD患者体内Treg细胞和Foxp3的表达水平明显低于正常对照组, 并且活动期低于缓解期. 目前多数学者[9]的研究证实了这一观点, 认为$CD4^+CD25^+$ Treg细胞数量的减少或功能异常可能是导致IBD发病的主要因素, $CD4^+CD25^+$ Treg细胞通过分泌产生抗炎细胞因子IL-10和TGF-β发挥其免疫抑制效. 但也有相反报道, Muratov *et al*[10]研究发现伴随着肠黏膜$Foxp3^+$数目的减少, IBD患者的临床症状也有所改善.

$CD4^+CD25^+$ Treg淋巴细胞免疫调节作用机制目前可能为: (1)转录因子: Foxp3属于Foxhead家族成员的转录因子, 是$CD4^+CD25^+$ Treg细胞相对较特异性的标志物, 表达于$CD4^+CD25^+$ Treg细胞, 介导$CD4^+CD25^+$ Treg细胞在胸腺发育、外周表达和功能维持[11]. Yu *et al*[12]研究发现肠系膜淋巴结$CD4^+CD25^+$ Treg细胞表达Foxp3 mRNA和蛋白, 抑制自体肠系膜淋巴结$CD4^+CD25^-$ T细胞增殖, 因此, Foxp3可能是调控$CD4^+CD25^+$ Treg细胞发育和功能的关键因子; (2)细胞因子: 依赖IL-10、TGF-β抑制先天或获得性免疫诱导的肠黏膜炎症反应[13]. TGF-β主要参与诱导和维持转录因子Foxp3的表达以及$CD4^+CD25^+$ Treg的增殖与活化, Foxp3通过下调Smad3进而增强TGF-β信号通路, 加强后者的免疫抑制活性. 活化后的Treg细胞可与高浓度TGF-β抗体特异性结合, 阻断Treg细胞的免疫抑制效应, 同时Treg细胞分泌的TGF-β与自身细胞膜受体结合, 激活后再借助细胞-细胞间接触从而发挥其免疫抑制效应[14]. 动物实验模型显示, 应用基因工程技术敲除小鼠IL-10或TGF-β基因, 可成功建立与人类极为相似的肠道炎症模型, 而用IL-10或TGF-β治疗则可明显减轻三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的大鼠结肠炎[15]. (3)调节抗原递呈细胞(APCs)的活性, 抑制来源于APCs的IL-12释放[16]. (4)诱导效应性T细胞凋亡, 介导效应性T细胞细胞因子的缺失[17]. 在炎症反应组织中, 提呈自身抗原的APCs活化后, 具有有效的自身反应性及抗原敏感性的$CD4^+CD25^+$ Treg细胞迅速转移到炎症反应部位, 与APCs结合后活化, 并抑制该组织的自身反应性$CD4^+CD25^-$ T细胞和$CD8^+$ T细胞的功能[18].

1.3 辅助性T细胞17(T helper 17 cells, Th17) 新近研究发现, 机体存在一种新型的不同于Th1、

Th2和Treg细胞的CD4$^+$效应性T细胞-Th17, 又称炎性辅助T细胞(Thi), 该细胞是由天然T细胞前体分化而来, 具有独立的分化和发育调节机制, 因其主要分泌IL-17, 不表达IFN-γ和IL-4, 被命名为Th17[19-20], 他的特异性转录调控因子为ROR-γt(retinoid-related orphan receptors-γt)[21]. 现有的研究发现IL-23、TGF-β和IL-6促进Th17的分化和表达, 而IL-12、IFN-γ、IL-4、T-bet以及Socs3蛋白则抑制其表达. IL-23属于IL-12家族, 包括p19和p40两个亚群, 有研究在IL-10$^{-/-}$介导的小鼠炎症性肠病的模型中发现, IL-23p19的缺失可以抑制小鼠结肠炎的发展. 更值得注意的是, 在IL-23p19$^{-/-}$的小鼠模型中没有IL-17的分泌, 并对IFN-γ和IL-4的产生没有影响. IL-23还可以促进抗CD3 mAb刺激记忆性CD4$^+$ T细胞表达IL-7和IL-6[22]. 但也有研究表明IL-23不是Th17发育所必需, 他只是通过上调IL-6、IL-1β和TNF-α的正反馈回路维持Th17的生存和扩增, 而TGF-β和IL-6共同存在是Th17细胞分化启动的必要条件[23]. Veldhoen *et al*[24]发现, 在大肠炎症模型小鼠的肠道和淋巴器官中, 可以同时检测出IFN-γ$^+$和IL-17$^+$的CD4$^+$ T细胞; Fujino *et al*[25]研究发现在IBD患者炎症急性期的肠黏膜内有大量的IL-17$^+$的细胞存在, 局部IL-17水平的检测表明CD患者血清以及肠黏膜局部的IL-17的水平都要高于UC患者, 从而提示了Th17细胞参与了炎症性肠病的发病过程.

2 树突状细胞(DCs)与IBD

DCs, 因其成熟时伸出许多树突样或伪足突起而得名, 是目前公认的体内抗原提呈功能最强的专职抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APCs), 与其他免疫细胞形成免疫调节网络, 参与识别、摄取、传递、处理并向T淋巴细胞提呈抗原, 产生免疫反应. DCs起源于骨髓CD34$^+$造血祖细胞, 在各种细胞因子的作用下分化为DCs前体细胞、未成熟DCs和成熟DCs; 根据是否表达表面标记CD11b和CD8a分为不同的亚型. DCs分布广泛, 在肠道主要分布于Peyer's集合淋巴结(PP)、滤泡相关肠上皮下穹隆的固有层及肠系膜淋巴结(MLN), 其突出特点是在不同成熟阶段、不同特异性亚型以及不同肠道部位, 产生不同的免疫调节功能, 维护肠道免疫平衡和内环境的稳态.

关于DCs的作用机制, 研究认为, 病原微生物入侵后, DCs通过PRRs(pattern recognition receptors), 包括Toll样受体(TLRs)识别微生物或者炎症过程中的产物如细胞因子IL-1、TNF-α、Ⅰ型干扰素以及CD40L诱导DCs成熟. 成熟的DCs表面具有丰富的有助于抗原提呈的分子, 主要诱导免疫激活, 上调共刺激因子, 增加与T细胞相互作用的有效面积以及趋化因子受体的表达, 促进DCs向淋巴组织移动, 激活T细胞, 分泌细胞因子, 诱导免疫应答. DCs也可以被病原体相关分子模式(PAMPs)通过识别其表面TCR直接激活, 分泌细胞因子引起免疫反应. 近来研究表明, 肠道DCs参与了IBD的重要病理过程. Drakes *et al*[26]在小鼠结肠炎的模型中将结肠DCs与自体固有层的T细胞共同培养时, 刺激IFN-γ和IL-6的产生, 其数量显著高于DCs与同源或异源脾脏T细胞共同培养产生的IFN-γ和IL-6. Hart *et al*[27]对IBD患者组及正常对照组肠黏膜固有层DCs进行分离和培养, 发现IBD患者DCs的TLRs的表达显著增强; CD患者炎症组织中DCs的CD40的突变/激活表达水平显著升高, 应用TNF-α治疗后, 患者DCs中升高的CD40水平下降; 在CD组, 更多的结肠DCs产生IL-6和IL-12, 而产生IL-10的DCs数量在IBD与正常对照组无显著差别. 这些资料证明, IBD患者的DCs被激活, 他们的微生物PRRs表达上调, 而且生成病理相关性细胞因子, 导致肠道炎症反应. 也有研究在小鼠结肠炎模型中发现, 炎症的早期阶段DCs的重新分布将导致肠上皮黏膜屏障受损, 而阻断TLRs则可调整DCs的重新分布[28]. Baumgart *et al*[29]通过比较活动性和非活动性IBD患者及其正常人血浆DCs和骨髓DCs的数量, 发现活动性IBD患者的血浆未成熟DCs数量明显下降, 且与肠道炎症程度相关, 缓解期IBD患者血浆DCs和骨髓DCs数量与正常对照组基本接近, 说明未成熟DCs可能下调免疫反应. 最近还有研究表明, 共表达巨噬细胞标志物(F4/80)和产生大量的IL-23的树突细胞亚群介导CD患者肉芽肿的形成[30]. 由此看来, DCs在IBD的发病机制中发挥着重要作用.

3 巨噬细胞(Mφ)与IBD

肠黏膜的Mφ与其他部位的Mφ一样起源于骨髓的造血干细胞. 正常肠黏膜定居的Mφ主要位于上皮下的黏膜固有层和集合淋巴小结肌层外, 表面有许多特异性的mAb识别标志物, 包括CD14、CD68、CD33及巨噬细胞金属弹力酶等. Mφ具有强大的吞噬功能及较强的抗原处理

■相关报道

Mulsow *et al*研究发现CD患者结肠狭窄区的胶原mRNA和胶原蛋白的表达增加, 成纤维细胞的收缩活力较非狭窄区明显大, 并发现TGF-β可通过PKC和ERK1/2MAP激酶介导的细胞信号传导途径增加纤维蛋白的表达和成纤维细胞的收缩活力.

■应用要点
探讨和确定肠黏膜免疫调节细胞在IBD发病机制中的作用，将为IBD的治疗提供新的靶点.

和递呈能力, 最近又有研究证明Mφ在维持内环境的稳态也扮演着重要的角色, 如分泌IL-10、TGF-β等多种抗炎细胞因子发挥免疫调节和介导炎症反应.

Mφ在吞噬病原体后, 经蛋白酶、氧自由基等杀灭病原体, 并将其分解为多肽和脂多糖等特异性抗原决定簇. 抗原决定簇从吞噬细胞的胞质转移到细胞膜, 与细胞膜主要组织相容抗原结合为复合物, 并将抗原信息传递给T细胞. T细胞抗原受体与病原体抗原-主要组织相容性复合物结合后, 抗原信息进入T细胞. 在吞噬和处理抗原的同时, Mφ膜上TLRs与致病微生物的PAMPs结合, 促使Mφ分泌促炎性因子, 如IL-21、IL-26、TNF-α、IL-12等, 抗炎因子IL-10和TGF-β等, 决定免疫反应和炎症反应的发展形式及剧烈程度. Kamada *et al*[31]研究发现CD组患者Mφ数目较正常对照组明显增加, 除了细胞数目的增加, 这些细胞产生的IL-23和TNF-α等细胞因子也明显增加, 分析Mφ可能通过固有层单核细胞依赖的IL-23和TNF-α促进IFN-γ的产生, 而IFN-γ的产生进一步促进IL-23诱导Mφ的分化, 如此肠内Mφ诱导的IL-23/IFN-γ正反馈反应促进了CD患者慢性肠道炎症的发病.

4 自然杀伤性T(NKT)细胞与IBD

NKT细胞是一种特殊类型的T淋巴细胞, 同时表达NK细胞和T淋巴细胞标记, 具有较为恒定的TCRα链(在小鼠中由Vα14-Jα281重排序列编码, 人类中则由Vα24-JαQ重排序列编码)、独特的CD1d限制性(只识别细胞表面CD1d分子提呈的脂类、蛋白质抗原)和细胞因子产生的高水平性. NKT细胞广泛分布于不同的组织中, 特别是肝脏和骨髓中, 一般占总淋巴细胞的1%-30%, 他既有增强免疫反应又有抑制免疫反应的双向免疫调节功能, 从而在抗感染、抑制自身免疫性疾病等方面发挥重要作用.

NKT细胞的活化有两条途径. (1)通过TCR激活: α-半乳糖酰基鞘氨醇(α-GalCer)与CD1d、TCR形成三联体激活NKT细胞, 从而诱导NK细胞的增殖和细胞毒性并合成分泌大量Th1和Th2类细胞因子, 调节机体先天性和获得性免疫反应. (2)细胞因子的活化作用: IL-12可促进NKT细胞大量合成和分泌Th1类细胞因子. IL-18可以促进NKT细胞释放Th2类细胞因子, 促进Th0细胞由Th1细胞向Th2细胞分化, 维持机体免疫反应的动态平衡. Heller *et al*[32]在用噁唑酮诱导的小鼠溃疡性结肠炎模型研究中发现, 若删除了NKT细胞、不能向NKT细胞提呈抗原以及缺乏NKT细胞相关TCR的小鼠均不能诱导该模型的形成, 推测噁唑酮可能是通过与CD1d的结合后递呈给NKT细胞, 导致NKT活化. 研究还发现α-GalCer可刺激NKT细胞分泌IL-13, 中和IL-13可阻断小鼠溃疡性结肠炎的发病. Fuss *et al*[33]的报告认为UC是由NKT细胞分泌的IL-13介导的非典型的Th2反应. 一般认为NKT是产生IL-4的唯一来源, Grose *et al*[34]研究发现IBD患者肠黏膜NKT细胞表达缺乏, IL-4水平低于对照组, 结果导致促进了Th1细胞反应, 而抑制了Th2细胞反应, 这可以解释CD是由Th1介导的免疫反应, 但不能解释UC的发病机制.

5 成纤维细胞与IBD

成纤维细胞是一种多形性细胞, 是间质细胞的一种, 主要存在于机体血管周围及脂肪组织等疏松结缔组织中. 正常的肠管内, 成纤维细胞位于黏膜下层、浆膜层和肌间结缔组织. 肠道内的细菌及其产物、表达CD40L的T淋巴细胞与成纤维细胞表面的CD40相互作用均可激活成纤维细胞. 激活的成纤维细胞可以分泌细胞因子如IL-6、IL-8, 还能生成趋化因子(包括CXC、CC、C和CX3C 4个亚家族)及前列腺素等, 并能上调某些细胞黏附分子, 如细胞间黏附分子及血管黏附分子等. Varona *et al*[35]发现敲除CCR6(CCL20受体)基因后, TNBS结肠炎小鼠肠黏膜的白细胞内稳态和细胞因子环境被改变, 炎症得以减轻, 提示CCL20/CCR6轴对体内肠道免疫反应的调控具有非常重要的作用. 在小鼠炎症性肠病模型中全身应用巨噬细胞炎性蛋白-1α(MIP-1α), 可以引发肠壁T细胞反应, 使局部IFN-γ、TNF-α水平增高, 继而引起固有层成纤维细胞产生基质金属蛋白酶(MMP)增多, 导致广泛黏膜损害[36]. Mulsow *et al*[37]研究发现CD患者结肠狭窄区的胶原mRNA和胶原蛋白的表达增加, 成纤维细胞的收缩活力较非狭窄区明显大, 并发现TGF-β可通过PKC和ERK1/2MAP激酶介导的细胞信号传导途径增加纤维蛋白的表达和成纤维细胞的收缩活力. 由此看来, 成纤维细胞及其分泌的细胞因子、趋化因子也参与了IBD尤其是CD不同阶段的发病机制.

6 结论

免疫调节细胞及相关细胞因子在IBD的发病机

制中的作用尚不十分清楚, 但各种免疫调节细胞及相关细胞因子间相互作用, 形成一个不可分割的网络, 共同促进了IBD的形成和发展. 探讨和确定肠黏膜免疫调节细胞在IBD发病机制中的作用, 将为IBD的治疗提供新的靶点. 已有一些制剂应用于动物实验和临床, 随着研究的不断深入, 将有可能在此方面有新的突破.

7 参考文献

1 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-2357

2 刘占举, 郭惠学, 胡军, 李富广, 杜英. IL-12对炎症性肠病患者外周血和肠黏膜固有层淋巴细胞激活和炎症介质分泌的影响. 郑州大学学报(医学版) 2006; 41: 818-820

3 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-573

4 Holland N, Dong J, Garnett E, Shaikh N, Huen K, Harmatz P, Olive A, Winter HS, Gold BD, Cohen SA, Baldassano RN, Kirschner BS, Heyman MB. Reduced intracellular T-helper 1 interferon-gamma in blood of newly diagnosed children with Crohn's disease and age-related changes in Th1/Th2 cytokine profiles. *Pediatr Res* 2008; 63: 257-262

5 van der Veen RC. Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1491-1500

6 Kelly-Welch AE, Hanson EM, Boothby MR, Keegan AD. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science* 2003; 300: 1527-1528

7 Pang YH, Zheng CQ, Yang XZ, Zhang WJ. Increased expression and activation of IL-12-induced Stat4 signaling in the mucosa of ulcerative colitis patients. *Cell Immunol* 2007; 248: 115-120

8 Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868-1878

9 Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiiwa Y, Harada N, Nawata H. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 677-686

10 Muratov V, Ulfgren AK, Engström M, Elvin K, Winqvist O, Löfberg R, Lundahl J. Decreased numbers of FoxP3-positive and TLR-2-positive cells in intestinal mucosa are associated with improvement in patients with active inflammatory bowel disease following selective leukocyte apheresis. *J Gastroenterol* 2008; 43: 277-282

11 Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336

12 Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 191-199

13 Powrie F. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1029: 132-141

14 Becker C, Fantini MC, Neurath MF. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17: 97-106

15 Maloy KJ, Salaun L, Cahill R, Dougan G, Saunders NJ, Powrie F. CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 2003; 197: 111-119

16 Sato K, Tateishi S, Kubo K, Mimura T, Yamamoto K, Kanda H. Downregulation of IL-12 and a novel negative feedback system mediated by CD25+CD4+ T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 226-232

17 Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 1353-1362

18 Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199-210

19 Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 821-852

20 Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6: 1133-1141

21 Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006; 126: 1121-1133

22 Maloy KJ. The Interleukin-23 / Interleukin-17 axis in intestinal inflammation. *J Intern Med* 2008; 263: 584-590

23 Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; 24: 179-189

24 Veldhoen M, Stockinger B. TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol* 2006; 27: 358-361

25 Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 65-70

26 Drakes ML, Blanchard TG, Czinn SJ. Colon lamina propria dendritic cells induce a proinflammatory cytokine response in lamina propria T cells in the SCID mouse model of colitis. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1291-1300

27 Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005; 129: 50-65

28 Silva MA, Jury J, Porras M, Vergara P, Perdue MH. Intestinal epithelial barrier dysfunction and dendritic cell redistribution during early stages of inflammation in the rat: role for TLR-2 and -4

■同行评价

本文内容有一定特色, 属目前研究热点问题, 对炎症性肠病的发病机制有理论和临床参考价值.

blockage. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 632-644
29 Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, Scheffold A, Sturm A, Wiedenmann B, Dignass AU. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* 2005; 54: 228-236
30 Mizoguchi A, Ogawa A, Takedatsu H, Sugimoto K, Shimomura Y, Shirane K, Nagahama K, Nagaishi T, Mizoguchi E, Blumberg RS, Bhan AK. Dependence of intestinal granuloma formation on unique myeloid DC-like cells. *J Clin Invest* 2007; 117: 605-615
31 Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, Sakuraba A, Kitazume MT, Sugita A, Koganei K, Akagawa KS, Hibi T. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *J Clin Invest* 2008; 118: 2269-2280
32 Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 2002; 17: 629-638
33 Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497
34 Grose RH, Thompson FM, Baxter AG, Pellicci DG, Cummins AG. Deficiency of invariant NK T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1415-1422
35 Varona R, Cadenas V, Flores J, Martínez-A C, Márquez G. CCR6 has a non-redundant role in the development of inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2937-2946
36 Pender SL, Chance V, Whiting CV, Buckley M, Edwards M, Pettipher R, MacDonald TT. Systemic administration of the chemokine macrophage inflammatory protein 1alpha exacerbates inflammatory bowel disease in a mouse model. *Gut* 2005; 54: 1114-1120
37 Mulsow JJ, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Transforming growth factor-beta promotes pro-fibrotic behavior by serosal fibroblasts via PKC and ERK1/2 mitogen activated protein kinase cell signaling. *Ann Surg* 2005; 242: 880-887, discussion 887-889

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 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称. 医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文. 公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD_{50}, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3187-3191
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

炎症性肠病肠黏膜屏障损伤机制

白爱平

白爱平, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006
通讯作者: 白爱平, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第一附属医院消化内科. baiap@163.com
电话: 0791-8692507
收稿日期: 2008-07-19 修回日期: 2008-08-30
接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-08

Intestinal barrier injury in inflammatory bowel disease

Ai-Ping Bai

Ai-Ping Bai, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Correspondence to: Ai-Ping Bai, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. baiap@163.com
Received: 2008-07-19 Revised: 2008-08-30
Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-08

Abstract

Intestinal mucosal barrier, which mainly contains epithalial cells and mucus layer, keeps physiological function of immune cells in intestine. During the process of inflammatory bowel disease (IBD), mucosal integrity and barrier function are broken, which leads to translocation of luminal contents such as bacterial antigens, thus inducing expression of proinflammatory cytokines and triggering immune response. Meanwhile, the produced proinflammatory cytokines influence epithelial and mucosal barrier function by inducing apoptosis of intestinal epithelia, altering the expression and cellular distribution of tight junction proteins, and reducing the production of mucus.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Intestinal mucosal barrier; Epithelium; Tight junction

Bai AP. Intestinal barrier injury in inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3187-3191

摘要

肠黏膜屏障是指将肠腔内细菌、抗原等物质与肠黏膜固有层免疫细胞隔离开, 避免固有层免疫细胞激活的肠黏膜结构, 主要由肠黏膜基底膜、上皮细胞层及其表面的黏液层所构成. 炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)肠黏膜屏障损伤的机制为: IBD发病时, 肠黏膜所产生的大量炎症细胞因子、炎症介质等损伤肠上皮细胞, 诱导上皮细胞凋亡; 影响上皮细胞紧密连接蛋白的表达及分布, 破坏上皮细胞间紧密连接; 抑制黏蛋白的产生, 破坏上皮细胞表面的黏液层, 造成肠黏膜屏障障碍.

关键词: 炎症性肠病; 肠黏膜屏障; 上皮细胞; 紧密连接

白爱平. 炎症性肠病肠黏膜屏障损伤机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3187-3191
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3187.asp

0 引言

肠黏膜屏障功能与消化系统疾病发病关系非常密切. 肠道感染、炎症、机械损伤等因素能诱导肠黏膜屏障功能异常, 使黏膜通透性增高, 导致肠腔内细菌、抗原等物质移位至黏膜固有层而激活免疫细胞, 诱导黏膜异常免疫反应的发生[1]. 另一方面, 肠道炎症性疾病如炎症性肠病发病(IBD)时, 一些损伤性因素如炎症细胞因子能破坏肠黏膜屏障, 加重黏膜异常免疫反应[2]. 目前普遍认为, 肠黏膜屏障功能异常是IBD发病的分子基础, IBD发病时肠黏膜屏障功能异常, 肠腔内抗原物质向肠黏膜固有层移位, 进一步激活固有层免疫细胞, 导致肠黏膜异常炎症反应[3]. 本文将对肠黏膜屏障的结构、IBD肠黏膜屏障损伤机制等进行介绍.

1 肠黏膜屏障的结构与组成

肠黏膜屏障是指将肠腔内细菌、抗原等物质与肠黏膜固有层免疫细胞隔离开, 避免固有层免疫细胞激活的肠黏膜结构, 主要由肠黏膜基底膜、上皮细胞层及其表面的黏液层所构成[4]. 肠黏膜上皮细胞相互连接, 形成了一个完整的生物屏障, 即肠上皮细胞屏障. 肠上皮细胞间的连接, 从

■背景资料
肠黏膜屏障是指将肠腔内细菌、抗原等物质与肠黏膜固有层免疫细胞隔离开, 避免固有层免疫细胞激活的肠黏膜结构, 主要由肠黏膜基底膜、上皮细胞层及其表面的黏液层所构成. 目前普遍认为, 肠黏膜屏障功能异常是IBD发病的分子基础, IBD发病时肠黏膜屏障功能异常, 肠腔内抗原物质向肠黏膜固有层移位, 进一步激活固有层免疫细胞, 导致肠黏膜异常炎症反应.

■同行评议者
潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室; 任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科

■研发前沿
改善肠黏膜屏障功能是IBD治疗的目标之一, 也是IBD的病理生理学研究热点.

顶端到基膜依次为紧密连接、黏附连接、桥粒和缝隙连接等, 其中以肠上皮细胞间的紧密连接(tight junction)最为重要. 肠上皮细胞紧密连接存在于靠近顶侧(肠腔侧)的细胞侧面, 是一个动态变化的、由多种蛋白及分子组成、具有多种功能的复合体. 上皮细胞紧密连接由紧密连接蛋白所构成, 这些蛋白主要包括闭锁蛋白(occludin)、Claudin、连接相关分子(JAM)等跨膜蛋白, 和闭锁小带(ZO)、丝状肌动蛋白等30多种胞内蛋白. 跨膜蛋白在细胞外与相邻细胞的跨膜蛋白相互作用, 封闭了细胞间的空隙. 跨膜蛋白在细胞内与ZO蛋白家族(包括ZO-1, ZO-2, 和ZO-3)、丝状肌动蛋白等胞内蛋白相互连接, 并被这些胞内蛋白固定(图1). 细胞间的紧密连接封闭了相邻肠上皮细胞间的空隙, 阻止肠腔内细菌、抗原等物质进入肠黏膜固有层激活固有层免疫细胞, 维护肠黏膜屏障功能的稳定, 避免了黏膜异常免疫反应的发生. 并且, 肠上皮细胞间的紧密连接在维持上皮细胞的形态结构、调节上皮细胞的分化、修复及细胞间物质运输、维护肠黏膜屏障功能和肠黏膜通透性等方面发挥了重要作用[5].

上皮细胞紧密连接主要由肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)所调节, MLC被Rho相关激酶(ROCK)和肌球蛋白轻链激酶(MLCK)等激酶磷酸化, 磷酸化MLC(pMLC)经肌球蛋白Ⅱ让含有紧密连接蛋白的细胞膜被细胞内吞(endocytosis), 在细胞质形成空泡, 跨膜蛋白随之降解[6].

肠黏膜黏液层主要由肠黏膜杯状细胞、上皮细胞分泌的黏蛋白(mucin, MUC)所组成, 黏蛋白为糖蛋白, 主要由MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5AB、MUC5AC、MUC6等组成[7]. 其中, 结肠的黏液层以MUC2为主, 而MUC3的表达则较少; 小肠的黏液层则以MUC3为主. 上皮细胞表达MUC, 受肠腔内微生物因素、短链脂肪酸等调节, 例如, 乳酸杆菌通过黏附肠上皮细胞, 诱导上皮细胞表达MUC2、MUC3, 并阻止致病性大肠杆菌对肠上皮细胞的黏附及损伤[8]; 丁酸盐也能诱导杯状细胞表达MUC[9].

2 IBD肠黏膜屏障损伤机制

IBD患者肠黏膜通透性是否增高尚存有争议, 有的学者认为, 与正常人群相比, IBD患者及直系亲属的肠黏膜通透性并不升高[10]; 而其他学者认为, IBD患者及直系亲属的肠黏膜通透性较正常人升高, 并且与CARD15基因突变具有很强的

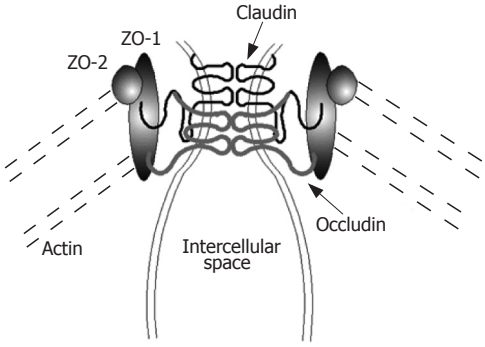


图 1 上皮细胞间的紧密连接.

相关性[11]. 目前普遍认为, 肠黏膜屏障功能异常参与了IBD的发病, IBD发病时肠黏膜屏障功能异常, 肠腔内抗原物质向肠黏膜固有层移位并激活固有层免疫细胞, 导致大量炎症细胞因子及介质的产生, 所产生的炎症分子进一步损伤肠黏膜屏障功能[3]. IBD肠黏膜屏障功能异常与如下因素有关.

2.1 *肠上皮细胞凋亡* 很多病理因素及肠道细菌感染能诱导肠上皮细胞发生凋亡, 例如, 沙门氏菌、致病性大肠杆菌、志贺氏痢疾杆菌、幽门螺杆菌、空肠弯曲杆菌等细菌对肠上皮细胞具有一定的黏附性, 通过对细胞的黏膜后侵入上皮细胞, 并诱导肠上皮细胞凋亡[12]. 另外, γ射线、活性氧自由基等物理及化学因素能直接损伤细胞DNA, 或激活线粒体凋亡途径, 诱导细胞凋亡[13-14].

IBD发病时, 大量的肠黏膜上皮细胞发生凋亡[15-16], 与凋亡细胞相邻的上皮细胞不能有效地封闭凋亡细胞所留下的空间, 导致肠黏膜通透性增高. 肠黏膜上皮细胞凋亡, 与炎症肠黏膜上皮层内淋巴细胞及固有层免疫细胞所产生的炎症细胞因子、炎症介质、活性氧自由基等有关, 这些细胞因子如TNF-α、INF-γ等能诱导上皮细胞内凋亡相关蛋白如Caspase-1的表达, 而抑制抗凋亡蛋白如Bcl-2等表达, 诱导上皮细胞发生凋亡[17-18]. 并且, 炎症肠黏膜的免疫细胞、炎症分子等能诱导肠上皮细胞表达Fas, 经Fas-FasL途径诱导上皮细胞凋亡[19].

有效地抑制肠上皮细胞凋亡, 能明显改善肠黏膜屏障功能. 针对炎症细胞因子诱导肠上皮细胞凋亡的关键作用, 有的学者通过使用这些炎症细胞因子特异性中和抗体治疗IBD, 发现炎症细胞因子的中和抗体能阻止炎症组织中肠上皮细胞发生凋亡, 降低肠黏膜通透性[20]. Steinkam *et al*发现, 肠黏膜神经胶质所分泌的神

经营养因子能明显改善肠黏膜屏障功能, 其机制为神经营养因子激活上皮细胞内MAPK及Akt等蛋白, 抑制炎症组织中肠上皮细胞发生凋亡[21].

2.2 炎症细胞因子等炎症介质诱导紧密连结蛋白的表达异常 IBD患者炎症肠黏膜紧密连接蛋白的表达及分布出现异常. Gassler *et al*发现, IBD患者炎症肠黏膜紧密连接蛋白的表达明显降低, 而炎症未累及的肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白的表达与正常人群的表达无差异, 说明上皮细胞紧密连接蛋白表达异常仅见于炎症肠组织[22]. IBD炎症肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白的表达及分布出现异常, 主要由炎症肠黏膜高表达的细胞因子诱导所致. 同时, 动物实验发现, 若先天性基因敲除上皮细胞紧密连接蛋白, 该基因缺陷动物出生后会出现类似IBD的肠道病理改变[23], 说明上皮细胞紧密连接蛋白表达、分布异常, 可能参与了IBD的发病.

在IBD发病早期, 肠黏膜IFN-γ水平明显增高[17], Utech *et al*发现, IFN-γ不仅能直接抑制上皮细胞紧密连接蛋白Occludin、Claudin-1/4、JAM-1等表达, 并能上调Rho相关激酶(ROCK)和肌球蛋白轻链激酶(MLCK)等紧密连接调节蛋白的表达[24], 促使紧密连接蛋白被细胞内吞, 即紧密连接蛋白在细胞的分布发生异常, 并被降解, 导致肠黏膜通透性增高. TNF-α不仅能直接影响上皮细胞紧密连接蛋白表达及分布, 并能与IFN-γ呈协同作用, 诱导MLCK等紧密连接调节蛋白的表达[2]. IBD炎症肠黏膜高表达的其他细胞因子如IL-15、IL-2、IL-1β等也能影响上皮细胞紧密连接蛋白表达及分布[25-26].

最近, 有关IL-13对肠上皮细胞紧密连接蛋白表达影响的研究引人注目. Heller *et al*研究发现, 小鼠恶唑酮结肠炎模型的肠黏膜自然杀伤T细胞分泌大量的IL-13[27]. 这些学者还发现溃疡性结肠炎(UC)肠黏膜固有层细胞高表达IL-13[28], 他们认为IL-13为UC的重要致炎细胞因子, 在UC发病中发挥重要的作用. 其他学者发现, IL-13能增高肠黏膜通透性, 损伤肠黏膜屏障功能[29], 并且, 受IL-13的诱导, 上皮细胞Claudin-2的表达也平行增高, Claudin-2能诱导肠黏膜针对小分子物质的通透性增高, 导致UC临床症状的出现, 如腹泻等[30].

其他的一些致病因子也能影响肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白的表达及分布. McDermott *et al*发现[31], 线虫感染能诱导正常小鼠肠黏膜通透性增高, 但对基因敲除肥大细胞特异性蛋白酶的小鼠肠黏膜通透性没有任何影响, 说明线虫感染通过诱导肥大细胞释放特异性蛋白酶, 损伤肠黏膜屏障功能. 其他致病因素如致病菌通过释放内毒素, 或直接侵袭, 影响肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白的表达及分布[32].

有些保护因素能调节肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白的表达及分布, 保护肠黏膜屏障功能. Boivin *et al*发现, 糖皮质激素在Caco-2细胞核内与其受体结合, 形成糖皮质激素-受体复合物后与MLCK的启动子结合, 阻止了TNF-α所诱导的MLCK等紧密连接调节蛋白的表达及上皮细胞通透性的增高[33]. 其他的因素如益生菌、维生素D等也能保护肠黏膜屏障. 益生菌黏附肠黏膜上皮细胞后, 能诱导肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白的表达[34]. 维生素D不仅能调节免疫细胞的功能, 还能保护肠黏膜屏障. 维生素D缺乏时肠黏膜屏障更容易受损伤, IBD发病的危险性也增高[35].

2.3 黏蛋白表达减少 黏蛋白主要由肠黏膜杯状细胞、柱状上皮细胞等表达, 损伤肠黏膜杯状细胞、柱状上皮细胞及影响这些功能的因素, 如炎症细胞因子、致病菌、放射线等, 都能抑制黏蛋白的表达. UC肠黏膜杯状细胞的数量明显减少, 导致MUC2的表达降低, 黏液层的厚度也较正常人薄[36-37], 并且, 黏液层中硫酸黏蛋白含量减少, 唾黏蛋白的含量增高, 上述黏液层的厚度及成份的改变与UC病情相关[38]. 由于克罗恩病(CD)的病变部位主要在小肠, 病变未累及结肠的CD患者结肠黏膜杯状细胞的数量变化不明显, 黏液层的成分及厚度与正常人相当. 不过, 由于小肠的黏液屏障主要由MUC3、MUC4、MUC5B等组成, 病变小肠的黏液层中MUC3、MUC4、MUC5B含量降低[39]. IBD患者上述黏液屏障的改变, 导致黏蛋白功能下降, 不能有效地清除肠黏膜表面所黏附的细菌, 黏液层中细菌含量增多, 容易诱导、加剧肠黏膜炎症反应.

3 结论

目前普遍认为, 肠黏膜屏障功能障碍与IBD发病关系密切, 精神压力、肠道感染、机械损伤等因素能诱导肠黏膜屏障功能异常, 使黏膜通透性增高, 导致肠腔内细菌、抗原等物质移位至黏膜固有层而激活免疫细胞, 诱导黏膜免疫反应的发生, 另一方面, IBD发病时, 一些损伤性因素能破坏肠黏膜屏障, 加重黏膜异常免疫反应. 并且, 治疗IBD的药物不仅能抑制肠黏膜炎症反

■相关报道

目前普遍认为, 肠黏膜屏障功能异常参与了IBD的发病, IBD发病时肠黏膜屏障功能异常, 肠腔内抗原物质向肠黏膜固有层移位并激活固有层免疫细胞, 导致大量炎症细胞因子及介质的产生, 所产生的炎症分子进一步损伤肠黏膜屏障功能.

■同行评价
本文内容较重要，设计构思合理，对IBD的发病原因有进一步的了解，有利于IBD的临床防治.

应，还能有效地调节肠黏膜屏障功能. 改善肠黏膜屏障功能是IBD治疗的目标之一，也是IBD的病理生理学研究热点. 目前国外有关肠黏膜屏障及功能的研究较多，方法学也比较成熟，但国内肠黏膜屏障功能的相关研究尚较少，今后有必要加强肠黏膜屏障功能的研究，尤其是与IBD发病关系的研究.

4 参考文献

1 Lewis K, Caldwell J, Phan V, Prescott D, Nazli A, Wang A, Soderhölm JD, Perdue MH, Sherman PM, McKay DM. Decreased epithelial barrier function evoked by exposure to metabolic stress and nonpathogenic E. coli is enhanced by TNF-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G669-G678

2 Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003; 171: 6164-6172

3 Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434

4 Arrieta MC, Bistritz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 2006; 55: 1512-1520

5 Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* 2006; 169: 1901-1909

6 Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 85-89

7 Corfield AP, Myerscough N, Longman R, Sylvester P, Arul S, Pignatelli M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. *Gut* 2000; 47: 589-594

8 Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 2003; 52: 827-833

9 Gaudier E, Jarry A, Blottière HM, de Coppet P, Buisine MP, Aubert JP, Laboisse C, Cherbut C, Hoebler C. Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1168-G1174

10 Vermeire S, Peeters M, Vlietinck R, Joossens S, Den Hond E, Bulteel V, Bossuyt X, Geypens B, Rutgeerts P. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA), phenotypes of IBD, and intestinal permeability: a study in IBD families. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 8-15

11 Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, Lochs H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 2006; 55: 342-347

12 Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 109-120

13 Kolesnick R, Fuks Z. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 5897-5906

14 Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Molecular fingerprints of neutrophil-dependent oxidative stress in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2007; 42: 787-798

15 Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O, Ricevuti L, Morera R, Cifone MG, Solcia E, Corazza GR. Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 1498-1507

16 Hagiwara C, Tanaka M, Kudo H. Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 758-764

17 Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-533

18 Koshiji M, Adachi Y, Sogo S, Taketani S, Oyaizu N, Than S, Inaba M, Phawa S, Hioki K, Ikehara S. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma (COLO 201) by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and/or interferon-gamma (IFN-gamma), resulting from down-modulation of Bcl-2 expression. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 211-218

19 Souza HS, Tortori CJ, Castelo-Branco MT, Carvalho AT, Margallo VS, Delgado CF, Dines I, Elia CC. Apoptosis in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease: evidence of altered expression of FasL and perforin cytotoxic pathways. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 277-286

20 Zeissig S, Bojarski C, Buergel N, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut* 2004; 53: 1295-1302

21 Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, von Boyen G, Egger B, Grossmann J, Ludwig L, Adler G, Reinshagen M. Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124: 1748-1757

22 Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermüller N, Otto HF, Autschbach F. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G216-G228

23 Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995; 270: 1203-1207

24 Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, Bruewer M, Turner JR, Mrsny RJ, Parkos CA, Nusrat A. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 5040-5052

25 Nishiyama R, Sakaguchi T, Kinugasa T, Gu X, MacDermott RP, Podolsky DK, Reinecker HC. Interleukin-2 receptor beta subunit-dependent and -independent regulation of intestinal epithelial tight junctions. *J Biol Chem* 2001; 276: 35571-35580

26 Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 2007; 178: 4641-4649

27 Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-

producing NK-T cells. *Immunity* 2002; 17: 629-638
28 Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497
29 Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129: 550-564
30 Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 2002; 115: 4969-4976
31 McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HR, Garrod DR, Grencis RK. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7761-7766
32 Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, Fioramonti J, Eutamene H, Bueno L. Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats. *Am J Pathol* 2005; 167: 1071-1079
33 Boivin MA, Ye D, Kennedy JC, Al-Sadi R, Shepela C, Ma TY. Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G590-G598
34 Otte JM, Podolsky DK. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G613-G626
35 Kong J, Zhang Z, Musch MW, Ning G, Sun J, Hart J, Bissonnette M, Li YC. Novel role of the vitamin D receptor in maintaining the integrity of the intestinal mucosal barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G208-G216
36 Shaoul R, Okada Y, Cutz E, Marcon MA. Colonic expression of MUC2, MUC5AC, and TFF1 in inflammatory bowel disease in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38: 488-493
37 Van Klinken BJ, Van der Wal JW, Einerhand AW, Büller HA, Dekker J. Sulphation and secretion of the predominant secretory human colonic mucin MUC2 in ulcerative colitis. *Gut* 1999; 44: 387-393
38 Einerhand AW, Renes IB, Makkink MK, van der Sluis M, Büller HA, Dekker J. Role of mucins in inflammatory bowel disease: important lessons from experimental models. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 757-765
39 Moehle C, Ackermann N, Langmann T, Aslanidis C, Kel A, Kel-Margoulis O, Schmitz-Madry A, Zahn A, Stremmel W, Schmitz G. Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J Mol Med* 2006; 84: 1055-1066

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 2008-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3192-3196
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

肠道抗原识别与炎症性肠病

黄美兰, 冉志华

■背景资料
IBD的患病率正不断上升, 但其确切的病因和发病机制仍不清楚, 对肠道细菌抗原的研究正越来越得到重视.

黄美兰, 冉志华, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科 上海市消化疾病研究所 上海市 200001
作者贡献分布: 黄美兰与冉志华对此文所作贡献均等; 此课题由冉志华负责、设计; 本论文写作由黄美兰与冉志华共同完成.
通讯作者: 冉志华, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科 上海市消化疾病研究所. z-ran@online.sh.cn
电话: 021-68383112
收稿日期: 2008-07-19 修回日期: 2008-09-12
接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-08

Recognition of luminal bacterial antigens in inflammatory bowel disease

Mei-Lan Huang, Zhi-Hua Ran

Mei-Lan Huang, Zhi-Hua Ran, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China
Correspondence to: Zhi-Hua Ran, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China. z-ran@online.sh.cn
Received: 2008-07-19 Revised: 2008-09-12
Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-08

Abstract
The incidence of inflammatory bowel disease (IBD) is increasing all over the world. However, it is rather difficult to treat IBD because its etiological factors and pathogenesis are still not clear. In recent years, the researches about the relationship between luminal bacterial antigens and IBD have provided new advances for its etiology and pathogenesis. We, in this paper, describe the present status in the recognition of luminal bacterial antigens in IBD patients which is correlated to the clinical phenotypes, prognosis and familial genetics of this disease, thus contributing to the treatment for IBD.

Key Words: Luminal bacteria; Antigen recognition; Inflammatory bowel disease

Huang ML, Ran ZH. Recognition of luminal bacterial antigens in inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3192-3196

摘要
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的患病率正不断上升, 但其确切的病因和发病机制仍不清楚. 对肠道抗原与IBD之间关系的研究为其发病机制的认识提供了新方向. 本文详述了肠道抗原识别与IBD在临床表型、预后及家族遗传间的关系, 为其进一步治疗IBD提供指导.

关键词: 肠道细菌, 抗原识别, 炎症性肠病

黄美兰, 冉志华. 肠道抗原识别与炎症性肠病. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3192-3196
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3192.asp

■同行评议者
潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室; 任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科

0 引言
克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC)统称为炎症性肠病(IBD), 都是胃肠道较常见的炎症性疾病. 但不管是在组织病理学还是解剖学上, 这两种疾病都存在差异. CD的特点是黏膜穿透性的全消化道炎症, 而UC则是累及结肠和直肠的黏膜表浅性肠道炎症, 但该两种疾病都与肠道微生物群相关. 目前有一种统一的假设认为, IBD的发生与有遗传易感性的个体其肠道黏膜对肠道微生物群的免疫反应失调有关[1-2].

IBD与肠道微生物群的相关性正在不断的明朗化, 但其潜在的分子学机制却仍不清楚. 肠道黏膜在体内暴露于最多的外源细菌抗原中, 在正常结肠中, 每克粪便中含有10^{12}个微生物. 最近的研究认为在微生物群、肠道上皮细胞和黏膜免疫细胞之间存在着相互作用[3], 而识别如脂多糖、肽聚糖等的先天性免疫反应, 在这些微生物/宿主间的相互作用及肠道内环境平衡方面起重要作用.

1 IBD遗传易感性
IBD患者存在肠道慢性非特异性炎症及其他相关的系统表现, 对其发病原理的最新假设是其对定植于肠道的细菌组分产生病理性免疫反应; 发病的易感因素是黏膜免疫反应和/或黏膜屏障功能的遗传性失调, 并由环境刺激而触发. 这些因素及他们间的相互作用可能也是疾病表型和病情进展的重要决定因子.

遗传易感性和肠道细菌间的相互作用目前正越来越受到关注. 动物实验的结果提示在面对同样的一种基因缺陷时, 并非所有的肠道共栖菌对该疾病的诱导作用都相同, 也并非所有的肠道共栖菌都可诱导异常的免疫反应. 例如, HLA B27/b2微球蛋白转基因鼠在肠道无菌状态下养殖时不发生结肠炎, 而当在肠道有正常非致病性盲肠共生菌时, 1 mo内即发生累及结肠和胃十二指肠的侵袭性疾病[4]. 当肠道内存在普通类杆菌时, 这些拥有相同遗传易感性的小鼠只发生不累及胃十二指肠的中度结肠炎; 而选择性的令肠道存在大肠杆菌时他们既无疾病发生也无T细胞激活[5]. 而同样的非致病细菌在具有另外一种遗传易感性的宿主中又可诱导其炎症发生. 所以, 在相同的宿主中, 不同种的肠道共栖菌可通过完全不同的动力学方式和解剖学分布选择性地触发免疫介导的肠道炎症反应[6]. 这些都说明遗传易感性和肠道抗原触发都是IBD疾病发生和发展的重要决定因素. 对特定细菌产生免疫反应并在其血清中有相应表达, 这可能是宿主基因和肠道细菌间相互作用的一种体现. 这些免疫反应如能代表IBD的遗传易感性及环境易感性, 则他们的定性和定量表达情况可作为IBD疾病表型的一种免疫学风险标志.

2 IBD中常见的肠道细菌自身抗原抗体

针对酿酒酵母菌的抗体(ASCA)反应是第一个被发现的以肠道细菌为抗原的CD特异的免疫反应, 其IgA和IgG抗体是直接针对递呈于酿酒酵母菌细菌壁上的一种寡甘露糖表位[7]. 到目前为止仍不十分清楚还有哪些特异的细菌抗原可与ASCA起交叉反应, 并导致CD患者有特异性地血清阳性表达. 有多项临床研究发现, ASCA在近60%的CD患者中有表达, 而在UC患者和非IBD患者中仅有少于5%的表达[8-10]. ASCA的特异性可用于诊断不明的IBD患者中将UC和CD鉴别, 也可将IBD和非IBD患者区别. ASCA对CD并发症有相当的预测作用, 故对该病疾病严重度判断也是一个重要指标[11].

最近还发现了另外3个代表性的标志物, 也是由肠道细菌驱动的免疫反应产生, 他们是抗大肠杆菌外膜孔道蛋白C(OmpC)抗体、抗荧光假单胞菌CD相关蛋白抗体[抗CD相关细菌序列(I2)]及抗CBir1鞭毛蛋白抗体. OmpC抗原是从肠道共生的大肠杆菌中纯化得到[12-13], 在37%-55%的CD患者及2%-11%的UC患者中存在抗OmpC抗体, 而仅在不到5%的非IBD个体中有表达. I2是在CD病情累及的结肠黏膜中分离得到, 在非受累的肠段中不存在, 这样也被认为是一种对CD特异较高的标志物. 针对该抗原的免疫反应在55%的CD患者中存在; 但其特异性仍有一定质疑, 因为在10%左右的UC患者血清及20%左右的非IBD患者血清中也有存在[12]. 由于该标志其诊断价值的局限性, 目前仍不清楚这一免疫反应在诊断方面可否提供更多信息, 仍需作进一步的研究. CBir1鞭毛蛋白是一种免疫显性抗原, 通过血清表达克隆方法鉴定出. 在结肠炎小鼠中有针对该抗原的强烈免疫反应(B细胞和CD4 T细胞)[14]. 有学者使用血清表达克隆(SEC)方法在结肠炎C3H/HeJBir小鼠中发现了一种主要的致病抗原-鞭毛蛋白(flagellins). 他们在不同的MHC单倍型的大量实验性结肠炎模型中都有明确发现[15]. 在结肠炎实验动物的肠系膜及脾T细胞培养中有明显的抗鞭毛蛋白反应, 将鞭毛蛋白特异的T细胞转导至免疫缺陷的动物后可诱导其发生结肠炎. 在人类IBD的血清中也存在抗鞭毛蛋白(非抗沙门氏菌鞭毛蛋白)的反应, 特别是在CD患者中, 而非UC或正常对照人群[15]. 由于认识到鞭毛蛋白是TLR5的配体[16], 这些结果不仅让大家对导致IBD发病的一些抗原有进一步认识, 也突出显现了IBD与先天性免疫之间的相关性. 后来将这些发现运用到了临床, 发现在近50%的CD患者中有针对CBir1鞭毛蛋白的血清学反应而UC及感染性肠道疾病和健康对照人群中表达很低甚至没有针对鞭毛蛋白的反应[15].

之前的几个抗体都是对CD的特异性较高, 相对而言, pANCA被认为是与UC或UC样疾病表型关系密切. 这种IBD特异的ANCA在荧光染色时于核周有特异性地的聚集并且对DNA酶敏感. 虽然至今还没有具体定义, 但认为pANCA针对的抗原是细胞核组蛋白H1[17]. 此抗原与有血管炎疾病患者中的蛋白酶3或髓过氧化物酶反应性不同. pANCA也可能是与某种肠道细菌抗原起交叉反应的抗体[13,18-19]. 尽管流行病学和方法学的不同, pANCA分别在近60%的UC患者及20%的CD患者的血清中有不同表达[8-10]. 而在不到5%的非IBD患者中亦有pANCA阳性表达.

CD有其临床表现及遗传异质性, 实验研究亦显示CD患者存在免疫表型异质性. Landers *et al*分析了330个CD患者的免疫表型异质性发现: 在56%的患者中有ASCA表达; 55%对OmpC有反

■创新盘点
对肠道抗原与IBD之间关系的研究为其发病机制的认识提供了新方向.

■应用要点
本文详述了肠道抗原识别与IBD在临床表型、预后及家族遗传间的关系，为该病进一步治疗提供了指导价值.

应; 50%对I2有反应; 23%则有pANCA表达[12]. 85%的患者至少对其中一个抗原有反应; 只有4%的患者对所有4个抗原有血清学反应. 在细菌抗原(ASCA, OmpC, I2)中, 78%患者对至少一个抗原有反应; 57%的患者对2个抗原有反应; 只有26%的患者对3个抗原都有反应. 这些抗原反应水平都相对稳定, 并随疾病的活动性改变而改变. 另外, 该实验根据CD患者对细菌抗原或自身抗原反应的不同, 将他们分成4类: 第1类是对ASCA有反应; 第2类是能够产生OpmC及I2抗体; 第3类是产生pANCA; 第4类是对任何抗原抗体实验都无反应.

有关于CBir1鞭毛蛋白的研究表明, 在对肠道细菌抗原ASCA, OmpC及I2都无特异抗体产生的CD患者中, 40%患者有针对CBir1鞭毛蛋白的抗体产生, 这可能暗示着一种新的免疫表型[14]. 抗CBir1抗体在40% pANCA阳性的CD患者中有表达, 而仅在4% pANCA阴性的CD患者中表达. 这种差异也提示着一种新的疾病发病机制, 有待人们进一步研究并在免疫表型方面对疾病有更深的了解.

3 临床表型与免疫表型

疾病临床表型并非总是一成不变. 回顾性研究对疾病从最初诊断成立至随访的最后时刻的疾病表型稳定性作了分析, 疾病的病变部位相对比较稳定, 而疾病的临床表现却有变化, 在20年左右的随访时间内, 80%以上的患者都从无并发症到有并发症发生(如肠道穿孔或狭窄等)[20-22].

免疫反应最先研究时其结果分析是作为区分UC和CD的手段, 即前者存在pANCA, 后者存在ASCA. 随着实验敏感性的提高, 也将这类抗体作为区分IBD和非IBD的工具. 尽管仍有一些矛盾和争议, 但在疾病诊断不明确时, 特别是在儿童患者中, 这些免疫标志物可以指导临床医生的诊断思路[10,23-24]. 由于不断有新的血清学标志物被发现, 而且检验的手段愈发精确, 通过免疫反应结果优化诊断准确性的设想正不断明朗化, 在临床上也越发有价值.

早期的实验研究表明, 尽管pANCA是一种UC特异的标志物, 但在近25%的CD患者中也有该抗体的表达. 这些CD患者被描述成是“UC样”的, 且发生并发症的可能性很小[25-27]. 但也有学者在较大样本的匈牙利人群中并未发现pANCA的表达与CD患者的“UC样”临床表现相关, 甚至在UC患者中亦不能预测其临床表型[28]. 高滴度的ASCA水平则与疾病发病年龄早、易发生狭窄和内部穿孔等疾病临床表现、需要外科行小肠手术相关[26-27]. 后来的研究发现同时存在ASCA IgA和IgG抗体的CD患者, 需要外科早期手术干预的风险明显增加[29]. 而在儿童患者中也发现, ASCA与CD疾病的快速进展关系密切[30]. 最近也有研究发现抗OmpC、抗I2抗体的表达与成人和儿童CD患者的疾病并发症亦相关[31-33]. 而抗CBir1抗体也是成人CD患者疾病并发症发生的独立关联因子[14]. 但在儿童CD患者中这种关联并不存在, 也暗示着儿童患者中抗CBir1抗体对其的作用与成人有潜在的不同[33].

针对不同的细菌抗原产生的免疫反应的数量及各种免疫反应的滴度水平都与CD产生并发症这一临床表型明显相关[31-33]. 理论上, 免疫反应水平越高表明其对某种细菌的免疫不耐受程度越大. 这样在临床上可以根据免疫效应水平来判断某种细菌导致的疾病炎症程度及累及范围大小情况, 从而对疾病的临床表现起到预测作用.

4 免疫遗传表型与疾病的自然病程

在疾病的并发症发生之前对其进行准确地预测是评估免疫反应潜在预测价值的真正所在, 对IBD疾病自然病程的发展也极为重要. 目前大家普遍接受这样一个理论, 即一个CD患者其免疫反应的存在及该反应的水平是不变的[30-31]. 有学者作了一个前瞻性研究, 对免疫反应在无并发症的CD患者中的预测价值作了评判[33], 他们发现从疾病确诊至发生并发症的平均时间是48 mo. 而对一个及一个以上血清学标志物有反应的群体中有8%发生并发症, 相比较下血清学阴性的患者中只有3%发生并发症. 那些至少有一个血清学阳性的患者, 其疾病进展的程度比血清学阴性的患者更快[33], 更早出现肠道穿孔和/或狭窄. 确定一些能够预测疾病进展、并发症发生的指标, 对患者进行风险分类, 有助于对患者制定更有效的治疗方法, 阻止并发症的发生从而延缓疾病的进展.

5 免疫表型的家族遗传性

免疫反应是否受到遗传因素的影响而从成为一种家族性特征, 这一假设还有待考证. ANCA在家族中的表达情况是所有自身抗体中第一个被研究的对象. 多个研究发现在UC患者的非患病亲属中, pANCA的阳性率较无家族史的对照

组高, 但这一发现并非在所有实验中都得到证实[34]. Sutton *et al*认为ASCA的定量和定性表达都有一定家族性[35]. 另外一个实验证明ASCA在有CD家族史的CD患者的发生率特别高, 但在有UC家族史的UC患者中及有IBD家族史(不管是UC家族史还是CD家族史; ASCA阳性还是ASCA阴性)的非患病亲属中其表达也较高. 而在非患病的家属中的ASCA高表达也可能意味着他们有发生CD或UC疾病的遗传倾向[36]. 在双胞胎人群中的实验表明, 单卵双生患IBD的双胞胎其ASCA滴度相似, 意味着ASCA血清滴度增高水平是由遗传决定[37]. 但这些实验对有ASCA阳性表达患者后代的发病情况未作进一步前瞻性研究. 最近的一个研究发现抗OmpC抗体亦有很强的家族聚集性[38]. 这个研究在多类IBD家庭中将抗OmpC抗体表达与对照组进行比较, 发现CD家族中其非患病家属抗OmpC抗体的表达与混合IBD家族(即UC和CD皆存在)的表达情况相似, 但他们都比正常家族对照组的表达要高. 另外, 这两组家庭其抗OmpC抗体的表达也高于仅有UC家族史的非患病家属. 至于这两种抗体是协调还是分别作用与IBD患者和其非患病家属, 结果提示他们之间可能有一定关联性, 但在CD患者中他们是完全不同的免疫反应, 更重要的是, 这些不同的免疫表型可导致不同的临床表型.

6 结论

对IBD肠道细菌抗原识别的各种研究, 给下面这一假设提供了依据: 即IBD患者发病是由由肠道细菌抗原触发, 通过易感基因调控不同的免疫过程, 表达特异的免疫表型并同时影响临床表型. 患者对不同细菌抗原产生的免疫反应可能与疾病的不同病理生理机制有关, 有遗传易感性的个体可能由不同的免疫反应而表现出不同的疾病特征. 今后的研究需要进一步验证免疫反应与疾病临床表现及预后之间的相关性, 同时也要发现更多更新的免疫反应, 为IBD发病的潜在机制提供更多信息. 在这个领域获得的进展可以为临床医生提供制定及时、有效治疗方案的一些帮助, 从而延缓IBD的疾病进展, 使IBD患者获得更长的生存时间.

7 参考文献

1 Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 495-549

2 Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-533

3 McCracken VJ, Lorenz RG. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol* 2001; 3: 1-11

4 Rath HC, Ikeda JS, Linde HJ, Schölmerich J, Wilson KH, Sartor RB. Varying cecal bacterial loads influences colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats. *Gastroenterology* 1999; 116: 310-319

5 Rath HC, Wilson KH, Sartor RB. Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with Bacteroides vulgatus or Escherichia coli. *Infect Immun* 1999; 67: 2969-2974

6 Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, Braun J, Huycke MM, Sartor RB. Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology* 2005; 128: 891-906

7 Sendid B, Colombel JF, Jacquinot PM, Faille C, Fruit J, Cortot A, Lucidarme D, Camus D, Poulain D. Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3: 219-226

8 Ruemmele FM, Targan SR, Levy G, Dubinsky M, Braun J, Seidman EG. Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; 115: 822-829

9 Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthilleul P, Cortot A, Grandbastien B, Charrier G, Targan SR, Colombel JF, Poulain D. Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* 1998; 42: 788-791

10 Hoffenberg EJ, Fidanza S, Sauaia A. Serologic testing for inflammatory bowel disease. *J Pediatr* 1999; 134: 447-452

11 Jaskowski TD, Litwin CM, Hill HR. Analysis of serum antibodies in patients suspected of having inflammatory bowel disease. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 655-660

12 Landers CJ, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin YC, Braun J, Targan SR. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens. *Gastroenterology* 2002; 123: 689-699

13 Cohavy O, Bruckner D, Gordon LK, Misra R, Wei B, Eggena ME, Targan SR, Braun J. Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope. *Infect Immun* 2000; 68: 1542-1548

14 Targan SR, Landers CJ, Yang H, Lodes MJ, Cong Y, Papadakis KA, Vasiliauskas E, Elson CO, Hershberg RM. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 2020-2028

15 Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M, Hershberg RM. Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 1296-1306

16 Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5.

■同行评价

IBD的发病与肠黏膜炎症表现和机体的免疫反应密切相关, 肠道抗原与IBD之间关系的研究为其发病机制的认识提供了新方向, 为IBD的进一步治疗提供参考.

Nature 2001; 410: 1099-1103
17 Eggena M, Cohavy O, Parseghian MH, Hamkalo BA, Clemens D, Targan SR, Gordon LK, Braun J. Identification of histone H1 as a cognate antigen of the ulcerative colitis-associated marker antibody pANCA. *J Autoimmun* 2000; 14: 83-97
18 Cohavy O, Harth G, Horwitz M, Eggena M, Landers C, Sutton C, Targan SR, Braun J. Identification of a novel mycobacterial histone H1 homologue (HupB) as an antigenic target of pANCA monoclonal antibody and serum immunoglobulin A from patients with Crohn's disease. *Infect Immun* 1999; 67: 6510-6517
19 Seibold F, Brandwein S, Simpson S, Terhorst C, Elson CO. pANCA represents a cross-reactivity to enteric bacterial antigens. *J Clin Immunol* 1998; 18: 153-160
20 Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* 2001; 49: 777-782
21 Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, Gendre JP. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 244-250
22 Smith BR, Arnott ID, Drummond HE, Nimmo ER, Satsangi J. Disease location, anti-Saccharomyces cerevisiae antibody, and NOD2/CARD15 genotype influence the progression of disease behavior in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 521-528
23 Dubinsky MC, Ofman JJ, Urman M, Targan SR, Seidman EG. Clinical utility of serodiagnostic testing in suspected pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 758-765
24 Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P. Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 730-734
25 Vasiliauskas EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H, Rotter JI, Vidrich A, Targan SR. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup. *Gastroenterology* 1996; 110: 1810-1819
26 Vasiliauskas EA, Kam LY, Karp LC, Gaiennie J, Yang H, Targan SR. Marker antibody expression stratifies Crohn's disease into immunologically homogeneous subgroups with distinct clinical characteristics. *Gut* 2000; 47: 487-496
27 Klebl FH, Bataille F, Bertea CR, Herfarth H, Hofstädter F, Schölmerich J, Rogler G. Association of perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies with Vienna classification subtypes of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 302-307
28 Papp M, Altorjay I, Norman GL, Shums Z, Palatka K, Vitalis Z, Foldi I, Lakos G, Tumpek J, Udvardy ML, Harsfalvi J, Fischer S, Lakatos L, Kovacs A, Bene L, Molnar T, Tulassay Z, Miheller P, Veres G, Papp J, Lakatos PL. Seroreactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with ileal involvement, noninflammatory disease behavior and NOD2/CARD15 genotype, but not with risk for surgery in a Hungarian cohort of IBD patients. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 984-992
29 Forcione DG, Rosen MJ, Kisiel JB, Sands BE. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody (ASCA) positivity is associated with increased risk for early surgery in Crohn's disease. *Gut* 2004; 53: 1117-1122
30 Desir B, Amre DK, Lu SE, Ohman-Strickland P, Dubinsky M, Fisher R, Seidman EG. Utility of serum antibodies in determining clinical course in pediatric Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 139-146
31 Mow WS, Vasiliauskas EA, Lin YC, Fleshner PR, Papadakis KA, Taylor KD, Landers CJ, Abreu-Martin MT, Rotter JI, Yang H, Targan SR. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 414-424
32 Arnott ID, Landers CJ, Nimmo EJ, Drummond HE, Smith BK, Targan SR, Satsangi J. Sero-reactivity to microbial components in Crohn's disease is associated with disease severity and progression, but not NOD2/CARD15 genotype. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2376-2384
33 Dubinsky MC, Lin YC, Dutridge D, Picornell Y, Landers CJ, Farrior S, Wrobel I, Quiros A, Vasiliauskas EA, Grill B, Israel D, Bahar R, Christie D, Wahbeh G, Silber G, Dallazadeh S, Shah P, Thomas D, Kelts D, Hershberg RM, Elson CO, Targan SR, Taylor KD, Rotter JI, Yang H. Serum immune responses predict rapid disease progression among children with Crohn's disease: immune responses predict disease progression. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 360-367
34 Achkar JP, Barmada MM, Duerr RH. Perinuclear neutrophil antibodies are not markers for genetic susceptibility or indicators of genetic heterogeneity in familial ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2343-2349
35 Sutton CL, Yang H, Li Z, Rotter JI, Targan SR, Braun J. Familial expression of anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in affected and unaffected relatives of patients with Crohn's disease. *Gut* 2000; 46: 58-63
36 Annese V, Andreoli A, Andriulli A, Dinca R, Gionchetti P, Latiano A, Lombardi G, Piepoli A, Poulain D, Sendid B, Colombel JF. Familial expression of anti-Saccharomyces cerevisiae Mannan antibodies in Crohn's disease and ulcerative colitis: a GISC study. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2407-2412
37 Halfvarson J, Standaert-Vitse A, Järnerot G, Sendid B, Jouault T, Bodin L, Duhamel A, Colombel JF, Tysk C, Poulain D. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in twins with inflammatory bowel disease. *Gut* 2005; 54: 1237-1243
38 Mei L, Targan SR, Landers CJ, Dutridge D, Ippoliti A, Vasiliauskas EA, Papadakis KA, Fleshner PR, Rotter JI, Yang H. Familial expression of anti-Escherichia coli outer membrane porin C in relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006; 130: 1078-1085

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3197-3199
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

炎症性肠病患者肠黏膜组织细胞凋亡

王晓娣

王晓娣, 卫生部中日友好医院消化内科 北京市 100029
通讯作者: 王晓娣, 100029, 北京市, 卫生部中日友好医院消化内科. xdwang60@hotmail.com
收稿日期: 2008-07-19 修回日期: 2008-09-01
接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-08

Apoptosis in bowel mucosal tissues of patients with inflammatory bowel disease

Xiao-Di Wang

Xiao-Di Wang, Department of Gastroenterology, China-Japan Friendship Hospital, Ministry of Health, Beijing 100029, China
Correspondence to: Xiao-Di Wang, Department of Gastroenterology, China-Japan Friendship Hospital, Ministry of Health, Beijing 100029, China. xdwang60@hotmail.com
Received: 2008-07-19 Revised: 2008-09-01
Accepted: 2008-09-08 Pubilshed online: 2008-10-08

Abstract
Inflammatory bowel disease (IBD) is non-specific inflammatory disease in intestinal tract, and its etiology and pathogenesis are still unclear, which are probably associated with environmental factors, genetic factors and immunological factors. Studies have demonstrated that cell apoptosis plays an important role in the development of IBD, characterized by increased intestinal epithelial cell apoptosis, apoptosis resistance of intestinal lamina propria lymphocytes and apoptosis delay of polymorphonuclear neutrophils. Further studies have indicated that activation of Fas/FasL signaling transduction, Bcl-2 and Bax pathways is involved in cell apoptosis. This paper highlights the potential role of mucosal cell apoptosis in the pathogenesis and treatment of IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Intestinal mucosa; Apoptosis

Wang XD. Apoptosis in bowel mucosal tissues of patients with inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3197-3199

摘要
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是发生在胃肠道慢性非特异性炎症性疾病, 其病因及发病机制尚未十分明确, 可能与环境因素、遗传因素和免疫因素等有关. 研究表明细胞凋亡在IBD的发病中起着重要的作用, 表现为炎症肠黏膜组织内存在细胞凋亡紊乱, 肠上皮细胞凋亡过度、黏膜固有层组织内淋巴细胞凋亡抵抗, 以及PMN凋亡迟滞, 这是造成IBD肠道炎症发生和持续的重要原因. 研究发现发生细胞凋亡的主要机制在于激活了Fas/FasL信号传导途径、Bcl-2和Bax调节途径而实施的, 研究细胞凋亡机制对揭示IBD的发病机制, 靶向性阻断细胞凋亡通路治疗IBD发生有重要意义.

关键词: 炎症性肠病; 肠黏膜; 细胞凋亡

王晓娣. 炎症性肠病患者肠黏膜组织细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3197-3199
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3197.asp

0 引言
细胞凋亡失调可导致肿瘤、自身免疫性疾病的发生. 越来越多的证据显示细胞凋亡对炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的组织损伤和免疫功能紊乱有着重要的影响.

1 细胞凋亡
细胞凋亡(apoptosis)是一种由基因调控的细胞自主性死亡过程. 细胞主动地运用基因调控程序引起自身死亡, 可使机体清除受损伤的、衰老的或无用的细胞, 而不引起机体微环境损伤和炎症, 对维持组织内环境的稳定、细胞群的动力学平衡和组织器官的各种生理功能和病理反应是不可缺少的[1]. 细胞凋亡涉及基因表达的级联反应. Fas基因介导的细胞凋亡需要天然配体(FasL)参与, 抗Fas抗体或FasL与Fas结合后可诱导Fas+细胞凋亡, Fas与FasL在淋巴细胞的发育分化、免疫反应调节中起重要作用[2]. Bcl-2是一种原癌基因, 是重要的凋亡抑制基因, 通过抑制凋亡而延长细胞存活时间, 但不能使细胞避免死亡及发生增殖. Bax-是Bcl-2的同源蛋白, 二者的作用相反, Bax能诱导细胞凋亡[3].

■背景资料
细胞凋亡是一种由基因调控的细胞自主性死亡过程. 细胞主动地运用基因调控程序引起自身死亡, 可使机体清除受损伤的、衰老的或无用的细胞, 而不引起机体微环境损伤和炎症, 对维持组织内环境的稳定、细胞群的动力学平衡和组织器官的各种生理功能和病理反应是不可缺少的. 越来越多的证据显示细胞凋亡对炎症性肠病的组织损伤和免疫功能紊乱有着重要的影响.

■同行评议者
潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室; 任建林, 教授, 厦门大学附属中山医院消化内科

■相关报道
Ueyam *et al*用分子生物学方法分析了IBD患者的FasL的表达, 发现FasL mRNA在UC患者中呈高表达, 但在CD患者中未见表达, 认为其可能的作用机制是FasL在细胞毒性T淋巴细胞有高表达, 可以诱导细胞的凋亡.

2 细胞凋亡与IBD

IBD包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(crohn's disease, CD), 是一类肠道慢性炎症性疾病, 其病因及发病机制尚未十分明确. 目前认为他的发病是多种因素相互作用的结果, 包括环境因素、遗传因素和免疫因素等[4]. 越来越多研究表明细胞凋亡在IBD的发病中起着重要的作用, 主要表现为上皮细胞凋亡加速, 炎症细胞凋亡减慢.

2.1 肠上皮细胞凋亡与IBD 肠黏膜上皮细胞增殖分化是一个动态变化的过程, 新生上皮细胞沿着隐窝绒毛轴向上迁移[5]. 生理状态下, 增殖的未成熟干细胞位于肠道隐窝的基底部. 正常结肠上皮细胞通过凋亡, 调控进入隐窝、轴的细胞数目, 清除突变的细胞, 是肠上皮细胞更新的生理过程[6]. 在病理情况下, 上皮细胞沿隐窝绒毛轴增殖-分化-凋亡的正常顺序被打破.

研究认为IBD患者肠上皮细胞的凋亡加速, 特别是活动期上皮细胞的凋亡明显增加, 参与IBD的发病. UC肠道病变区域或其附近的区域, 结肠隐窝上皮细胞均有凋亡现象. 用多种凋亡标记物检测UC和正常结肠凋亡的程度和范围, 发现活动性UC病变区域上皮细胞凋亡发生的程度和范围都高于正常组织[7]. 上皮细胞的凋亡导致大量上皮细胞提前死亡, 而发生上皮细胞大量凋亡的原因主要集中在激活Fas/FasL信号传导途径、Bcl-2和Bax调节途径而实行的[8-9].

正常结肠上皮细胞表达Fas, 只有少量FasL阳性细胞散在分布于黏膜固有层内, 有研究显示在UC组织中, FasL阳性的细胞数量明显增加, 与表达Fas的结肠上皮细胞结合即引起凋亡, 大量结肠上皮细胞凋亡导致上皮细胞损伤, 破坏肠黏膜屏障, 因此, 认为上皮细胞的大量凋亡与Fas/FasL信号传导途径密切关联[10]. 最新的一个研究也显示Fas调节途径是UC的发病机制之一[11].

Ueyam *et al*用分子生物学方法分析了IBD患者的FasL的表达, 发现FasL mRNA在UC患者中呈高表达, 但在CD患者中未见表达, 认为其可能的作用机制是FasL在细胞毒性T淋巴细胞有高表达,可以诱导细胞的凋亡[12]. 日本Iimura *et al*[13]观察到UC肠黏膜中Bax蛋白及mRNA表达均下调, 而Bcl-2与正常对照无明显差异, 提示Bax/Bcl-2系统可能不参与UC肠上皮细胞凋亡的调控.

UC的特征性表现在于结肠上皮表浅而广泛的缺失和固有层的炎症改变. UC病变结肠的上皮细胞凋亡和增殖的平衡打破, 细胞凋亡的速率超过代偿性的细胞增殖, 导致上皮层的缺失, 这可能是UC上皮层破坏的机制.

2.2 炎性细胞凋亡与IBD IBD的特征之一是炎症细胞浸润, 包括淋巴细胞、浆细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等. 炎症细胞的持续存在导致结肠黏膜炎症反应的持续. 目前的研究表明细胞凋亡参与组织中炎症细胞数量的调节, IBD患者炎性细胞凋亡减慢.

Suzuki *et al*[2]研究则显示UC患者表达FasL的淋巴细胞和单核细胞数增多, 与表达Fas的结肠上皮细胞结合即引起上皮细胞凋亡, 而肠黏膜固有层T淋巴细胞的凋亡抵抗, T细胞凋亡的减少[14]. Asakura *et al*研究认为Fas/FasL途径介导的凋亡导致UC患者肠黏膜CD4及CD8 T细胞亚群的不平衡[15]. 有研究表明UC患者Bcl-2表达明显增多, 且与疾病活动性有关, 活动期较非活动期升高更为明显, 提示Bcl-2表达增加可抑制活化的自身反应性淋巴细胞凋亡, 产生自身免疫反应, 加重炎症程度. 应用皮质激素治疗后好转的UC患者Bcl-2表达下调, 表明皮质激素可通过抑制Bcl-2表达诱导活化的自身免疫反应性淋巴细胞凋亡, 减轻炎症反应[16]. 对CD的研究则发现CD患者T淋巴细胞对多种诱导凋亡途径表现耐受. CD患者炎症区域黏膜固有层T细胞Fas表达减少, FasL表达的水平则高于对照组, 结肠黏膜固有层FasL表达水平增多, 而T细胞及巨噬Fas表达没有相应增多, 提示了T细胞对Fas/FasL信号途径转导凋亡的敏感性下降[17]. 同时大量的研究显示, 在IBD的组织和外周血液中, 一些细胞因子的水平增高, 这些细胞因子与肠黏膜固有层淋巴细胞凋亡的关系密切. IL-2的缺乏可诱导T淋巴细胞凋亡, 而CD患者对此诱导途径耐受[18], 在IBD中IL-15在肠黏膜中的过度表达, 则介导T淋巴细胞逃避凋亡[19].

以上研究结果提示, IBD肠黏膜病变部位的T细胞出现凋亡抵抗, 细胞凋亡减少使活性T细胞不能及时清除而大量聚集, 产生针对自身肠组织的免疫反应. T细胞的增殖与凋亡失衡引起的肠黏膜局部活性T细胞蓄积是导致肠道慢性炎症的主要原因之一.

中性粒细胞是机体免疫防御系统中的一类重要细胞, 同时也是一类十分重要的炎症细胞. PMN可产生多种炎性介质, 如前列腺素、白三烯、血小板活化因子和活化酶等, 他是最早到达炎症部位的炎症细胞可介导和放大炎症反应[20]. PMN是以凋亡的方式被巨噬细胞识别、吞噬而清除的, 因此, 中性粒细胞的凋亡是机体自我限

制炎症反应的一种重要方式[21]. 而IBD患者组织中PMN的蓄积可能与其凋亡迟滞有关.

对IBD患者肠组织和外周血中性粒细胞的凋亡研究证实, IBD患者PMN的凋亡受到抑制. Brannigan *et al*[22]研究认为IBD患者的中性粒细胞在体外的条件下, 细胞凋亡较对照组减少, 这种现象与患者血清IL-8增高有关, 患者中性粒细胞促Caspase 3减少也有助凋亡减少, 因为促Caspase 3减少可导致PMN自然凋亡减少和Fas/FasL途径介导凋亡减少. 尚有研究指出, IL-2、IL-6、TNF, 粒细胞集落刺激因子(G-CSF)等对PMN的凋亡有抑制作用[23-24]. PMN凋亡的抑制使炎症反应持续存在, 进一步引起组织损伤, 这可能是IBD肠组织损伤的重要机制之一.

3 结论

IBD中存在细胞凋亡紊乱, 表现为肠黏膜上皮细胞凋亡过度、黏膜固有层淋巴细胞凋亡抵抗, 和PMN凋亡迟滞, 这是造成IBD肠道炎症的发生和持续的重要原因. 深入研究IBD中细胞凋亡失调机制有助于揭示IBD的发病机制, 对其加以阻断可能为今后IBD的治疗提供新的途径.

4 参考文献

1 Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462

2 Suzuki A, Sugimura K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Suzuki K, Ishizuka K, Mochizuki T, Honma T, Narisawa R, Asakura H. Fas/Fas ligand expression and characteristics of primed CD45RO+ T cells in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1278-1283

3 Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ, Loh DY, Nakayama K, Nakayama K, Hickman JA. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 1995; 108 (Pt 6): 2261-2271

4 Danese S, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4807-4812

5 Allan A, Bristol JB, Williamson RC. Crypt cell production rate in ulcerative proctocolitis: differential increments in remission and relapse. *Gut* 1985; 26: 999-1003

6 Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107 (Pt 12): 3569-3577

7 Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, Kobayashi N, Nakane PK. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996; 180: 152-159

8 Martin CA, Panja A. Cytokine regulation of human intestinal primary epithelial cell susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G92-G104

9 Lu J, Caplan MS, Saraf AP, Li D, Adler L, Liu X, Jilling T. Platelet-activating factor-induced apoptosis is blocked by Bcl-2 in rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G340-G350

10 严谨, 欧阳钦, 陈代云, 刘卫平, 李甘地. 溃疡性结肠炎中Fas/FasL介导的结肠上皮细胞凋亡. 中华消化杂志 2001; 21: 397-399

11 Xia B, Yu YH, Guo QS, Li XY, Jiang L, Li J. Association of Fas-670 gene polymorphism with inflammatory bowel disease in Chinese patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 415-417

12 Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, Isozaki K, Kitamura S, Kondo S, Miyagawa J, Kanayama S, Shinomura Y, Ishikawa H, Ohtani T, Nezu R, Nagata S, Matsuzawa Y. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut* 1998; 43: 48-55

13 Iimura M, Nakamura T, Shinozaki S, Iizuka B, Inoue Y, Suzuki S, Hayashi N. Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47: 228-235

14 Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol* 2001; 22: 21-26

15 Asakura H, Suzuki A, Ohtsuka K, Hasegawa K, Sugimura K. Gut-associated lymphoid tissues in ulcerative colitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23: S25-S28

16 江学良, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 齐风, 王东, 张修礼. 溃疡性结肠炎患者淋巴细胞凋亡调控蛋白的表达. 世界华人消化杂志 1999; 7: 903-904

17 Souza HS, Tortori CJ, Castelo-Branco MT, Carvalho AT, Margallo VS, Delgado CF, Dines I, Elia CC. Apoptosis in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease: evidence of altered expression of FasL and perforin cytotoxic pathways. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 277-286

18 Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, Imada A, Binion DG, Musso A, West GA, Dobrea GM, McCormick TS, Lapetina EG, Levine AD, Ottaway CA, Fiocchi C. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 1999; 163: 1081-1090

19 Liu Z, Geboes K, Colpaert S, D'Haens GR, Rutgeerts P, Ceuppens JL. IL-15 is highly expressed in inflammatory bowel disease and regulates local T cell-dependent cytokine production. *J Immunol* 2000; 164: 3608-3615

20 Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* 2003; 82: 82-90

21 Simon HU. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev* 2003; 193: 101-110

22 Brannigan AE, O'Connell PR, Hurley H, O'Neill A, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock* 2000; 13: 361-366

23 Ina K, Kusugami K, Hosokawa T, Imada A, Shimizu T, Yamaguchi T, Ohsuga M, Kyokane K, Sakai T, Nishio Y, Yokoyama Y, Ando T. Increased mucosal production of granulocyte colony-stimulating factor is related to a delay in neutrophil apoptosis in Inflammatory Bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14: 46-53

24 Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994; 15: 7-10

■同行评价

本文提供了炎症性肠病患者与肠黏膜组织细胞凋亡方面较有意义的信息, 构思合理, 科学性较强, 具有较好的学术价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3200-3203
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

重视研究肠道神经系统在炎症性肠病发病中作用

张德奎, 甘华田

■背景资料
炎症性肠病(IBD)是一类慢性复发性肠道炎症性疾病, 其病因主要涉及遗传, 免疫异常, 感染, 环境和精神因素等多方面, 其发病机制仍不清楚.

张德奎, 甘华田, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041
国家自然科学基金资助项目, No. 30770983
通讯作者: 甘华田, 610041, 四川省成都市人民南路三段17号, 四川大学华西医院消化内科. ganhuatian@hotmail.com
收稿日期: 2008-07-19 修回日期: 2008-09-03
接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-08

Emphasis on the role of intestinal nervous system in the pathogenesis of inflammatory bowel disease

De-Kui Zhang, Hua-Tian Gan

De-Kui Zhang, Hua-Tian Gan, Department of Gastroenterology, Western China Hospital, Sichuang University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770983
Correspondence to: Hua-Tian Gan, Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuang University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. ganhuatian@hotmail.com
Received: 2008-07-19 Revised: 2008-09-03
Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-08

Abstract
The etiology of inflammatory bowel disease, Crohn's disease and ulcerative colitis remains unknown. In a great many studies about the pathogenesis of IBD, great attention was paid to the immune dysfunction, genetic susceptibility, and various environmental factors, whereas the effects of enteric nervous system (ENS) were neglected. In fact, increasing evidence now indicates that ENS is involved in the pathogenesis of IBD. In this paper, we review the abnormal regulation of enteric nervous system in IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Enteric nervous system; Enteric glial cell

Zhang DK, Gan HT. Emphasis on the role of intestinal nervous system in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3200-3203

摘要
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类慢性复发性肠道炎症性疾病, 其病因主要涉及遗传, 免疫异常, 感染, 环境和精神因素等多方面, 其发病机制仍不清楚. 最近有多项研究表明在炎症性肠病中肠神经系统(enteric nervous system, ENS)结构和功能表现异常, 损害ENS可引发鼠类肠道出现腹泻, 血便等肠炎的表现, 均提示ENS调控异常参与了的IBD发病, 本文就目前炎症性肠病ENS调节异常的研究现状作简要评述.

关键词: 炎症性肠病; 肠神经系统; 肠胶质细胞

张德奎, 甘华田. 重视研究肠道神经系统在炎症性肠病发病中作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3200-3203
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3200.asp

0 引言
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类慢性复发性肠道炎症性疾病, 其病因主要涉及遗传, 免疫异常, 感染, 环境和精神因素等多方面, 其发病机制仍不清楚. 最近有多项研究表明在炎症性肠病中肠神经系统(enteric nervous system, ENS)结构和功能表现异常, 损害ENS可引发鼠类肠道出现腹泻, 血便等肠炎的表现, 均提示ENS调控异常参与了的IBD发病, 而维持肠道神经调控功能的正常有助于改善的IBD[1-2]. 本文就目前炎症性肠病ENS调节异常的研究现状作简要评述, 以期引起国内同行对ENS异常改变在IBD发病中的作用的重视.

1 IBD肠组织中神经元的改变
虽然IBD中肠神经元数目变化一直有争议, 但目前多数研究表明IBD患者肠黏膜中肠神经元的数目明显减少, 其中克罗恩病(Crohn's disease, CD)中肠神经元减少较溃疡性结肠炎(ulcer colitis, UC)尤为明显. 在TNBS结肠炎模型也证实了这点, 在炎症期间每个神经丛中的神经元都减少并持续到炎症消退后, 但神经节的数目大致没有改变. 由于严重的炎性损害出现在接近黏膜表面的黏膜下层, 黏膜下神经元数目减少更为明显[3]. 减少肠神经元数目可以改变肠道

■同行评议者
彭曦, 副研究员, 重庆市西南医院烧伤研究所; 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化所

收缩和黏膜转运功能, 影响神经递质如乙酰胆碱等的释放[4]. ENS中神经元数目减少是肠道炎性损伤的结果[3].

2 IBD时肠胶质细胞的改变

肠胶质细胞(enteric glial cells, EGC)是肠神经系统中除神经元外的另一类重要的细胞群体, 其在IBD发病中作用必将成为今后研究的焦点. 胶质细胞伸出突起相互连接在整个胃肠道形成广泛的网络, 不仅分布于肌层, 黏膜下层, 黏膜的固有层也有, 最远到达绒毛的顶端[5]. 目前国外已有成熟的分离培养EGC的方法[6]. 重要的研究有去除(Ablate)EGC后小鼠表现出便血, 肠腔出血, T细胞侵润和黏膜下血管内血栓形成等类似于人类CD的表现[1-2]; 在实验性结肠炎及IBD患者的活检标本中EGCs数目增加, 在CD的炎性肠段中EGCs增加较非炎性肠段显著, 而在IBD中UC较CD患者EGCs增生显著. 但在IBD中EGC的GFAP免疫反应阳性的突起在CD患者炎性和非炎性标本中较正常对照组和UC破坏明显, 用Western blot法证实每克肠组织中GFAP含量在CD中显著低于正常组, 而UC组高于正常组[7].

EGCs的作用可归纳以下几点: (1)EGC可以维持肠上皮细胞的完整性和上皮层的通透性; (2)调控黏膜的分泌; (3)参与控制黏膜下层血管的完整性和通透性; (4)分泌神经营养素和神经营养因子, 提供糖原, L-精氨酸和介导神经元与血循环之间物质交换, 促进神经元的存活, 神经干细胞的分化增殖; (5)参与调节肠道的炎症和免疫反应[5]. (6)体外将EGC与肠上皮细胞共培养, EGC可抑制上皮细胞的增殖[8].

有待解决的问题, EGC区别于脑星形胶质细胞的确切的表面标记; EGC可以分为两类, 这两类EGC之间功能有何不同, 在IBD时如何变化; 黏膜下神经丛和肌间神经丛中EGC的形态和功能在IBD不同病期是否相同; EGC调节炎症和免疫反应的具体机制等等, 均需进一步的研究明确.

3 IBD时轴突的异常

在IBD时肠神经轴突确实发生变化, 最早研究在CD患者标本中发现存在严重而广泛的神经轴突坏死, 而其他炎性疾病如UC中要么没有, 要么就只有单一轴突的较小程度的坏死[9], 因而有作者将CD患者中肠神经轴突的退变/坏死做为CD区别于其他炎症性肠道病变的标志[10]. 也有研究认为节段性回肠囊袋的肠自主神经轴突坏死可能参与了CD的发病[11]. 在TNBS结肠炎模型中, 有研究认为在平滑肌细胞中神经分布的密度在炎症期间与炎症后没有改变[3], 但随后的研究表明在炎症开始第4天环行肌中总轴突的数目减少了将近50%, 而内在神经分布的密度在炎症的2 d急剧减少到不足对照组的30%, 虽然环行肌数目在炎症期间增加了3倍, 但由于轴突的数目也增加了3倍, 故从第6天开始内在神经分布的密度恢复正常水平. 表达酪氨酸羟化酶的外在神经轴突在炎症开始时没有减少, 而在第6-16天增殖明显. 该研究表明内在神经轴突减少是结肠炎早期的病变, 虽然由于轴突增殖其数量恢复了, 但短暂的去神经化也许促进了环行平滑肌的增生. 内外轴突不同的损伤与修复模式暗示了炎性肠管动力改变的结构基础[12].

4 IBD时神经递质的异常

EGC和肠神经元细胞可以分泌多种神经营养素和营养因子, 包括GDNF, NGF, NT3, NT4, GFAP, P物质, NPY, CCK, VIP, 甘丙肽, 生长抑素等. 此外EGC还可分泌细胞因子, 如IL-1, IL-6等炎性细胞因子. 在炎性条件下, GDNF的分泌是增加的, 在肠道里, EGC是GDNF唯一的来源细胞. 体外培养EGC在IL-1, LPS, TNF-α刺激下, GDNF分泌量显著增加, 而且在刺激因子撤除后, 分泌可以持续约12 h, 实验研究发现炎症性肠病时黏膜下神经丛中$GFAP^+$的肠胶质细胞数目显著增加, 这可以解释炎症时黏膜内GDNF增加的原因[7]. 在TNBS实验性结肠炎时, GDNF含量在诱导后8 h开始上升, 与第5天达到顶峰, 以后逐渐下降, 到第14天时降到最低[13]. 增加的GDNF对肠道的炎症有治疗作用, 主要通过抗上皮细胞凋亡, 保持上皮的完整性, 降低黏膜通透性, 减少肠腔内细菌等抗原物质进入黏膜固有层内, 刺激炎性细胞释放致炎细胞因子. GDNF对培养的脑小胶质细胞分泌IL-1, IL-6没有影响[14], 对于IBD时肠道炎性细胞分泌致炎性细胞因子是否有影响目前未见报道. GDNF可以促经肠神经元的存活; 可以抑制巨噬细胞的移动. 可以促进胰腺癌细胞[15], 输尿管上皮细胞的增殖[16], 但能否促进IBD时肠黏膜上皮细胞的增殖未见报道. 虽然也有研究报道GDNF并不能降低肠上皮屏障通透性[17], 但综上所述目前认为GDNF在肠道是一种保护性因子.

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是一种多功能的神经营养因子, 除了EGC外, 上皮

■**研发前沿**
以往对IBD发病机制的研究大多把注意力集中在遗传, 免疫异常, 感染, 环境等方面, 而忽视了肠道神经系统在IBD发病中的作用.

■相关报道
最近有多项研究表明在炎症性肠病中肠神经系统(ENS)结构和功能表现异常, 损害ENS可引发鼠类肠道出现腹泻, 血便等肠炎的表现, 均提示ENS调控异常参与了的IBD发病, 而维持肠道神经调控功能的正常有助于改善的IBD.

细胞, 淋巴细胞, 单核细胞, 肥大细胞以及嗜酸性粒细胞等免疫细胞均可以分泌此因子, 在脑炎, 肺炎, 关节炎等炎症时, 其分泌显著增加. 抹除(Ablate)NGF和NT3后实验性结肠炎小鼠的肠道炎症显著增剧表明NGF有保护性作用[18]. NGF主要可以抑制单核细胞跨上皮移动[19], 降低淋巴细胞, 调控单核细胞分泌钙基因相关肽CGAP, 将免疫反应转化为抗炎反应[20].

神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)是由肠神经元分泌的一种36氨基酸肽. 在中枢与外周神经系统广泛表达, 主要参与肌体的能量代谢, 食物摄入, 应激反应和伤害性感知. 在IBD实验性鼠类模型中NPY表达增加. 但增加的NPY的作用有争论, 一方面, 由于IBD时动物食欲减低或表现为厌食, 有认为增加的NPY可能增加动物食欲, 促进体力恢复, 但在IBD动物中补充NPY并没有增加食物摄入量; IBD时其受体Y1表达增加, 在Y1受体基因敲除小鼠或用Y1受体拮抗剂可以缓解DSS结肠炎DAI和组织学评分, 表明NPY和其受体增加加剧了IBD病情, NPY和其受体有可能成为IBD治疗的靶点[21]. 另一方面, 用Y1受体缺陷小鼠实验表明, Y1受体负性调控T1细胞, 减少T1细胞分泌的IL-12和IFN-γ, 又激活抗原递呈细胞, 似乎又有保护性作用[22].

P物质(Substance P, SP)是一种11肽的氨基酸, 肠道里主要由EGC分泌, 其受体NK-1R在肠肥大细胞, 上皮细胞, 淋巴细胞及巨噬细胞表面均分布. SP物质在IBD时的表达及作用在目前备受争议. 多数IBD患者活检标本及动物结肠炎模型显示SP物质含量显著增高. Eysselein *et al*研究表明在结肠炎早期, SP物质及其受体的表达是明显下调的[23]. SP物质的作用, 一般认为他是一种致炎细胞因子, 与憩室炎时的腹痛有关, 慢性应激通过释放SP物质加重肠炎[24]; SP物质活化人结肠上皮细胞JAK-STAT途径, 刺激COX2和PGE2的表达[25]; 肠系膜贮脂细胞上分布有SP物质受体NK-1R, 在炎症性肠病时SP与NK-1R作用, 活化NF-κB, 促进IL-8的分泌[26]. 最近陆续有报道认为SP对肠炎有保护作用, 如SP可以促进损伤后黏膜的血流,作用于成纤维细胞促进TGF-β的产生, 有助于上皮细胞的重建[27]; 与受体NK-1R作用活化AKT抵抗上皮细胞凋亡[28]; 与TH1细胞上的NK-1R作用有助于控制干扰素-γ分泌[29].

5 结论

总之, (1)在IBD时肠神经系统的调控的确发生了改变, 如EGC, 神经元, 轴突无论其数目结构均有改变, 许多神经递质分泌异常. (2)炎症损伤导致肠神经元数目减少, 是不可逆性的, 是引起肠道运动与黏膜分泌失调的原因. (3)肠胶质细胞反应性增生, 通过分泌多种神经递质和与上皮细胞, 血管内皮细胞等细胞作用似乎起限制炎性损伤的作用. (4)神经递质分泌异常, 大部分递质与肠道上皮细胞, 免疫细胞以及血管内皮细胞等相互作用发挥保护性作用, 而部分神经递质释放加剧了炎症.

以往对IBD发病机制的研究大多把注意力集中在遗传, 免疫异常, 感染, 环境等方面, 而忽视了肠道神经系统在IBD发病中的作用. 尽管IBD的发病不可能是单一因素的结果, 肠道神经系统在其中的作用可能只是原因之一, 但是肠道神经系统的作用决不能被忽视. 应该是加强研究肠神经系统在IBD发病中作用的时候了.

6 参考文献

1 Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV. Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 1998; 93: 189-201

2 Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13306-13311

3 Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol* 1999; 155: 1051-1057

4 Davis KA, Masella J, Blennerhassett MG. Acetylcholine metabolism in the inflamed rat intestine. *Exp Neurol* 1998; 152: 251-258

5 Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS. Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 2003; 41: 81-93

6 Hanani M, Lin Z, Louzon V, Brenner T, Boneh A. Phorbol esters alter the morphology of cultured guinea-pig myenteric glia via a protein kinase C-independent mechanism. *Neurosci Lett* 1997; 233: 61-64

7 von Boyen GB, Steinkamp M, Geerling I, Reinshagen M, Schäfer KH, Adler G, Kirsch J. Proinflammatory cytokines induce neurotrophic factor expression in enteric glia: a key to the regulation of epithelial apoptosis in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 346-354

8 Neunlist M, Aubert P, Bonnaud S, Van Landeghem L, Coron E, Wedel T, Naveilhan P, Ruhl A, Lardeux B, Savidge T, Paris F, Galmiche JP. Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF-beta1-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G231-G241

9 Dvorak AM, Silen W. Differentiation between

Crohn's disease and other inflammatory conditions by electron microscopy. *Ann Surg* 1985; 201: 53-63
10 Steinhoff MM, Kodner IJ, DeSchryver-Kecskemeti K. Axonal degeneration/necrosis: a possible ultrastructural marker for Crohn's disease.Axonal degeneration/necrosis: a possible ultrastructural marker for Crohn's disease. *Mod Pathol* 1988; 1: 182-187
11 Dvorak AM, Onderdonk AB, McLeod RS, Monahan-Earley RA, Cullen J, Antonioli DA, Blair JE, Morgan ES, Cisneros RL, Estrella P. Axonal necrosis of enteric autonomic nerves in continent ileal pouches. Possible implications for pathogenesis of Crohn's disease. *Ann Surg* 1993; 217: 260-271
12 Lourenssen S, Wells RW, Blennerhassett MG. Differential responses of intrinsic and extrinsic innervation of smooth muscle cells in rat colitis. *Exp Neurol* 2005; 195: 497-507
13 Steinkamp M, Geerling I, Seufferlein T, von Boyen G, Egger B, Grossmann J, Ludwig L, Adler G, Reinshagen M. Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124: 1748-1757
14 Chang YP, Fang KM, Lee TI, Tzeng SF. Regulation of microglial activities by glial cell line derived neurotrophic factor. *J Cell Biochem* 2006; 97: 501-511
15 Esseghir S, Todd SK, Hunt T, Poulsom R, Plaza-Menacho I, Reis-Filho JS, Isacke CM. A role for glial cell derived neurotrophic factor induced expression by inflammatory cytokines and RET/GFR alpha 1 receptor up-regulation in breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 11732-11741
16 Michael L, Davies JA. Pattern and regulation of cell proliferation during murine ureteric bud development. *J Anat* 2004; 204: 241-255
17 Savidge TC, Newman P, Pothoulakis C, Ruhl A, Neunlist M, Bourreille A, Hurst R, Sofroniew MV. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology* 2007; 132: 1344-1358
18 Reinshagen M, Rohm H, Steinkamp M, Lieb K, Geerling I, Von Herbay A, Flämig G, Eysselein VE, Adler G. Protective role of neurotrophins in experimental inflammation of the rat gut. *Gastroenterology* 2000; 119: 368-376
19 Flügel A, Matsumuro K, Neumann H, Klinkert WE, Birnbacher R, Lassmann H, Otten U, Wekerle H. Anti-inflammatory activity of nerve growth factor in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of monocyte transendothelial migration. *Eur J Immunol* 2001; 31: 11-22
20 Bracci-Laudiero L, Aloe L, Buanne P, Finn A, Stenfors C, Vigneti E, Theodorsson E, Lundeberg T. NGF modulates CGRP synthesis in human B-lymphocytes: a possible anti-inflammatory action of NGF? *J Neuroimmunol* 2002; 123: 58-65
21 Hassani H, Lucas G, Rozell B, Ernfors P. Attenuation of acute experimental colitis by preventing NPY Y1 receptor signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G550-G556
22 Wheway J, Mackay CR, Newton RA, Sainsbury A, Boey D, Herzog H, Mackay F. A fundamental bimodal role for neuropeptide Y1 receptor in the immune system. *J Exp Med* 2005; 202: 1527-1538
23 Eysselein VE, Reinshagen M, Cominelli F, Sternini C, Davis W, Patel A, Nast CC, Bernstein D, Anderson K, Khan H. Calcitonin gene-related peptide and substance P decrease in the rabbit colon during colitis. A time study. *Gastroenterology* 1991; 101: 1211-1219
24 Simpson J, Sundler F, Humes DJ, Jenkins D, Wakelin D, Scholefield JH, Spiller RC. Prolonged elevation of galanin and tachykinin expression in mucosal and myenteric enteric nerves in trinitrobenzene sulphonic acid colitis. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 392-406
25 Koon HW, Zhao D, Zhan Y, Rhee SH, Moyer MP, Pothoulakis C. Substance P stimulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 expression through JAK-STAT activation in human colonic epithelial cells. *J Immunol* 2006; 176: 5050-5059
26 Karagiannides I, Kokkotou E, Tansky M, Tchkonia T, Giorgadze N, O'Brien M, Leeman SE, Kirkland JL, Pothoulakis C. Induction of colitis causes inflammatory responses in fat depots: evidence for substance P pathways in human mesenteric preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5207-5212
27 Felderbauer P, Bulut K, Hoeck K, Deters S, Schmidt WE, Hoffmann P. Substance P induces intestinal wound healing via fibroblasts--evidence for a TGF-beta-dependent effect. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 1475-1480
28 Koon HW, Zhao D, Zhan Y, Moyer MP, Pothoulakis C. Substance P mediates antiapoptotic responses in human colonocytes by Akt activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 2013-2018
29 Weinstock JV, Blum A, Metwali A, Elliott D, Bunnett N, Arsenescu R. Substance P regulates Th1-type colitis in IL-10 knockout mice. *J Immunol* 2003; 171: 3762-3767

■同行评价

本文比较详细地论述了肠神经系统结构与功能异常在IBD发病中的作用和可能机制，论据较有力，逻辑性强，具有一定理论意义和潜在的临床指导价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3204-3207
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

焦点论坛 HIGHLIGHT TOPIC

防御素与炎症性肠病

吴小平, 欧阳春晖

■背景资料
防御素表达异常与消化系统、呼吸系统、皮肤科及耳鼻喉科等多种疾病的发病相关. 动物实验表明, 肠道内的防御素在防止肠道免遭食物及饮水传播致病菌方面起到了关键的作用.

吴小平, 欧阳春晖, 中南大学湘雅二医院消化内科 湖南省长沙市 410011
通讯作者: 吴小平, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院消化内科. wxp2006@126.com
收稿日期: 2008-08-14 修回日期: 2008-08-30
接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-08

Defensin and inflammatory bowel disease

Xiao-Ping Wu, Chun-Hui Ouyang

Xiao-Ping Wu, Chun-Hui Ouyang, Department of Gastroenterology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China
Correspondence to: Xiao-Ping Wu, Department of Gastroenterology, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. wxp2006@126.com
Received: 2008-08-14 Revised: 2008-08-30
Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-08

Abstract
It is commonly considered that genetic and environmental factors (e.g. infection) contribute to the occurrence of inflammatory bowel disease (IBD). In recent years, defensin family was attracting great attention because of its role in the innate defense system. In this paper, we review the defensin's types, distribution, gene expression regulation, antimicrobial effects and relationships with IBD as well as its future application prospects.

Key Words: Defensin; Inflammatory bowel disease; Innate immune; Differential; diagnosis Crohn's disease; Ulcerative colitis

Wu XP, Ouyang CH. Defensin and inflammatory bowel disease. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3204-3207

摘要
目前普遍认为炎症性肠病是在遗传背景的前提下, 环境因素(如感染等)导致肠道免疫紊乱而发病. 近年来, 防御素(defensin)家族在先天性防御体系中的作用日益受到研究学者的重视. 本文就防御素的种类、分布、基因表达调控、其抗微生物作用, 以及其与炎症性肠病的关系和应用前景作一综述.

关键词: 防御素; 炎症性肠病; 先天免疫; 鉴别诊断; 克罗恩病; 溃疡性结肠炎

吴小平, 欧阳春晖. 防御素与炎症性肠病. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3204-3207
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3204.asp

■同行评议者
张筱茵, 副教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院消化疾病研究所

0 引言
炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种肠道非特异性慢性复发性炎症, 主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD). IBD的病因和发病机制至今尚未完全阐明. 目前普遍认为本病是在遗传背景的前提下, 环境因素(如感染等)导致肠道免疫紊乱而发病. 近年来, 防御素(Defensin)家族在先天性防御体系中的作用日益受到研究学者的重视. 防御素表达异常与消化系统、呼吸系统、皮肤科及耳鼻喉科等多种疾病的发病相关. 动物实验表明, 肠道内的防御素在防止肠道免遭食物及饮水传播致病菌方面起到了关键的作用. 多篇文献报道炎症性肠病患者体内防御素水平发生了明显的变化, 从而推测防御素表达或功能缺陷可能是导致发生IBD的重要原因之一. 本文综述防御素的种类、分布、基因表达调控及其抗微生物作用, 探讨其与炎症性肠病的关系及应用前景.

1 人类防御素的分类及生物学功能
1980年, Lehrer *et al*首次从兔肺巨噬细胞分离并纯化出两个阳离子性极强的小分子物质, 后又从人中性粒细胞胞质颗粒中发现了一系列一级结构相似的小分子物质, 由于他们均具有广谱抗微生物活性而被命名为防御素[1]. 防御素是哺乳动物内在最大的防御系统, 可分为α-防御素、β-防御素和θ-防御素. 人体主要以前两种为主, 目前已经识别和分离出6种α-防御素和6种β-防御素. α防御素由29-36个氨基酸组成, 其中α-防御

素1-4主要位于中性粒细胞中, 又被称为中性粒细胞多肽(HNP), 而α-防御素5、6(HD-5、HD-6)则由小肠潘氏细胞分泌. 人类肠道中潘氏细胞α-防御素在肠内表达量在各个肠段有所不同, 其中十二指肠的表达量最少, 空肠、回肠内表达相对较多. β-防御素(HBD)由36-42个氨基酸组成, 广泛表达于黏膜、上皮组织中. HBD-1主要在肾脏、泌尿生殖道和其他上皮细胞内表达, 在正常人扁桃体内也可检测到, HBD-2主要表达于损伤的皮肤、口腔黏膜以及被感染的肺部上皮, HBD-3主要在人的角化细胞和气道上皮细胞内表达, HBD-4主要表达于睾丸、子宫、中性粒细胞、甲状腺、肺及肾也有低水平表达, HBD-5和HBD-6仅仅在附睾细胞中表达[2-3]. α-防御素主要参与全身系统和小肠宿主防御, 而β-防御素还可刺激未成熟的树突细胞和T细胞参与后天获得性免疫反应[4]. 防御素具有广谱抗微生物活性, 对革兰阳性和阴性菌、厌氧菌、真菌以及一些有包膜病毒等都有强大的杀灭作用, 特别是在低盐离子、低血浆蛋白条件下, 防御素的杀菌浓度可达到1-10 mg/L[5]. 对于防御素生物活性机制, 大部分认为主要和微生物的细胞膜结构有关: 防御素带正电荷, 可通过静电作用与带负电荷的细菌胞膜脂质双层结合, 对G^+菌, 防御素在细菌胞膜的电势驱动下, 以单聚体或多肽体聚集, 并通过分子移动在胞膜上形成多个通道, 使细胞内容物渗出, 导致细胞死亡. 而对G^-菌, 防御素则无法先穿过细菌外膜, 而是通过与胞壁脂多糖(LPS)结合, 竞争性取代在LPS分子间起桥梁作用的二价阳离子(Ca^{2+}、Mg^{2+})穿过外膜, 然后再在内膜上形成通道, 最终造成细菌胞膜的完整性被破坏, ATP、K^+丢失, 呼吸受阻, 最终导致细菌死亡. β防御素可以诱导T细胞($CD8^+$ T细胞)与幼稚$CD4^+$ T细胞的迁移, 其次是通过与树突状细胞的CCR6受体结合募集非成熟性的树突状细胞(immature dendritic cell, IDC). 防御素还能通过诱导细胞因子的释放和介导IDC协同刺激分子的表达上调, 促进IDC的成熟, 进而活化T细胞, 触发特异性免疫应答[6-7]. β-防御素也可以诱导肥大细胞脱颗粒和一些炎症前期细胞因子的产生, 促进中性粒细胞在炎症部位的聚集, 扩大病变的局部炎症反应.

2 防御素与CD

CD是一种严重的肠道慢性炎症, 病变部位可发生于整个消化道的任何部位, 病变形式多变. CD的发病是遗传因素与环境因素共同作用的结果. 随着基因组研究的发展, 一些基因包括NOD2(CARD15)(MIM 605956), 1DLG5(MIM 04090)以及OCTN(MIM 604190、603377)都被认为与CD的发生相关[8]. 肠道防御素是机体抵御外源性致病因子的重要屏障, 而在CD患者中, 肠道的防御素表达水平存在着差异. 回肠段病变的CD患者, 回肠潘氏细胞防御素HD-5和HD-6的表达均较正常人和非回肠段病变的CD患者明显降低, 而且这种防御素水平变化与NOD2基因突变密切相关. 结肠组织活检发现无NOD2基因突变的CD患者结肠组织中HD-5和HD-6的表达量反而增高[9]. 而HD-5、6的水平降低影响了肠道黏膜的天然屏障作用, 导致黏膜细菌附着引起进一步损害. Wehkamp *et al*[10]报道在回肠CD患者中, 作用于潘氏细胞分化和防御素表达的调节因子Tcf-4 mRNA的表达量明显下降, 这导致了潘式细胞分泌防御素水平和灭菌活性的双重降低, 而Tcf-4的WNT传导通路和潘氏细胞防御素的关联变化与NOD2的基因型无关, 提示这可能是一个重要的导致回肠CD发病的机制之一. 与小肠性CD不同的是, 结肠CD主要表现为HBD-2(MIM 602215)、HBD-3(MIM 606611)和HBD-4的表达异常[11]. 目前已经证明, HBD的基因簇位于染色体8p23.1上, 其DNA拷贝数在正常人群中有很大差异性. 应用RT-PCR和即时PCR方法均可以检测到在CD病变的结肠上, HBD-2表达明显下调, CD炎症黏膜HBD-2的表达与非特异性结肠炎比较明显降低. CD非炎症黏膜区和无炎症的对照组比较, HBD-2的水平没有差异[12]. 目前一些研究表明, 应用SASP或者5-ASA治疗CD同时使用外源性抗生素(如甲硝唑、奎诺酮类抗生素), 其效果与同时应用糖皮质激素效果接近, 并能有效缓解肛门窦道引起的疼痛, 促进窦道愈合, 这从另一方面佐证了CD的发病与防御素的缺陷有关[13].

3 防御素与UC

过去认为UC在欧美国家多见, 但近年来中国文献报道的病例数显著增多[14]. 溃疡性结肠炎病变主要累及结肠. 正常人结肠黏膜很少表达HD-5和HD-6, 而UC患者结肠上皮细胞中HD-5和HD-6 mRNA的表达水平显著高于正常人, 且HD-6的表达具有特异性, 即在非感染性的结肠炎中表达并不明显[9,13-14]. 人HBD-1在肠道上皮细胞有持续的表达, 不受外界因子的影响, 起基础防御的功能. 有研究发现UC和CD结肠黏膜

■相关报道
多篇文献报道炎症性肠病患者体内防御素水平发生了明显的变化, 从而推测防御素表达或功能缺陷可能是导致发生IBD的重要原因之一.

■应用要点
目前生产防御素的研究尚处初始阶段, 随着基因工程的进步, 有望生产出大量防御素并将为IBD的治疗带来新的飞跃.

HBD-1的基因表达量有所降低, 这种降低可能导致黏膜抗菌活性的降低, 从而导致细菌入侵机体继发炎症应答. 在感染的结肠特别是UC中HBD-2可被诱导性表达, 且这种诱导性表达在UC患者进行全结肠手术后的回肠型肛门囊袋黏膜中仍有相似改变[15]. HBD-2只在感染的情况下被诱导表达, 在非感染的情况下, 不论是UC还是CD, 患者肠道HBD-2表达均很低. 这说明UC发生可能由于HBD-2被过度表达从而加重肠道炎症反应有关. HBD-3的表达量和HBD-2存在一定的相关性, 在UC时亦有明显增加[16]. HBD-4 mRNA水平在UC的肠上皮细胞中明显增高. UC患者的HD表达量与UC病变范围的范围、程度成正相关而CD中未发现有明显的变化[17].

4 防御素与其他胃肠道炎症

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染与萎缩性胃炎、消化性溃疡、胃癌及胃黏膜相关性淋巴组织淋巴瘤的发生密切相关. 胃黏膜感染*H pylori*后, 中性粒细胞的趋化及趋化因子的出现均提示有先天性免疫机制的参与[18]. 人β2防御素2(HBD-2)由上皮细胞产生, 在胃肠黏膜表面发挥防御作用, 对革兰染色阴性细菌具有高效的杀菌作用[19]. Hamanaka *et al*[20]采用RT 2PCR、免疫组化、原位杂交等方法对6例*H pylori*阳性和6例*H pylori*阴性胃炎患者的胃黏膜组织研究结果表明, *H pylori*感染者胃黏膜上皮和胃小凹处HBD-2 mRNA表达显著上调, 而*H pylori*阴性者未见明显HBD-2 mRNA条带. *H pylori*根除后, HBD-2 mRNA的转录水平和蛋白的免疫活性均显著降低. 提示HBD-2可能参与*H pylori*介导胃黏膜的炎性反应.

5 防御素的药物研发

传统抗生素对机体均有程度不同的毒副作用, 且致病菌几乎可对现有的所有抗生素产生耐药性. 与之相比, 防御素具有广谱抗微生物活性, 而微生物不易产生抗体, 因而无耐药性. 防御素对同种属细胞无毒性作用, 因而无抗生素的毒副作用. 因防御素的广谱抗菌和低毒性, 从理论上说有望成为最理想的新型杀菌药物. 但从有机体中分离防御素成本极高, 使防御素的研究和应用受到限制, 因此通过基因工程手段大量生产防御素是一有效途径. 1999年, Linzmeier *et al*[21]应用P1(探针)和BAC(细菌人工染色体)克隆的方法, 确定了人α-防御素与β-防御素基因位于8p23, 其顺序为HDEFA5(HD25)、HDEFA1/1A(HNP21/3)、DEFA4(HNP24)、HDEFA6(HD26)、HDEFB1(HBD21). Piers *et al*[22]最早将人防御素克隆表达, 他将HNP21和CEME(人工合成的杂合抗菌肽)分别与GST (Glutathione2s2transferase)、oprF(paeruginosa outermembrance protein F)、SPA(staphylococcal protein A)、IgG结合序列连接, 在大肠杆菌和金黄色葡萄球菌中融合表达, 但遗憾的是, 只发现CEME有抗菌活性, 而HNP21则不具活性. 2004年, Wang *et al*采用了细菌偏爱的密码子, 将hBD2基因串连起来, 并以多拷贝形式在大肠杆菌中表达, 使其表达量提高了9倍[23]. Harder *et al*[24]把hBD3与His2Tag连接, 导入大肠杆菌中表达,经肠激酶消化, HPLC纯化, 得到了具有天然活性的防御素, 但产量不详. 陈姗 *et al*[25]和李春丽 *et al* 在大肠杆菌中成功克隆表达了有活性的hBD3. 对于防御素基因的克隆和表达研究已取得一定进展, 随着研究的深入, 采用基因工程方法生产的防御素必将在研究和医药中发挥重要作用[26].

6 结论

就IBD领域而言, 防御素的研究前景可归纳如下三方面: (1)对防御素的深入研究有助于IBD发病机制的阐明. 防御素作为天然免疫系统的重要组成部分, 其表达下调或功能缺陷在IBD的发病中起着重要作用. 但IBD时防御素变化的始动因素及表达调控机制是什么? 防御素怎样影响免疫应答从而怎样保护性地影响疾病的进程? 这些问题远未明了, 有待深入研究. (2)如前所述, 不同防御素亚型尤其是HBD在UC和CD中的表达量有明显差异, 因此防御素亚型的研究可望为UC与CD二者间的鉴别诊断提供帮助. (3)防御素对IBD的治疗前景. 防御素的抗微生物作用及IBD时防御素表达变化已如前述. 肠道细菌的存在是IBD发病的前提条件. 肠道黏膜的免疫应答可抵抗细菌对黏膜的损害而不致发病, 而防御素是维持免疫应答的重要因子. 因此提高防御素水平对防治IBD具有重要意义. 此外, 在IBD的发展过程中, 患者往往合并细菌感染, 通常临床上需加用抗生素治疗, 而用外源性防御素代替抗生素的优势已如前述. 但目前生产防御素的研究尚处初始阶段, 随着基因工程的进步, 有望生产出大量防御素并将为IBD的治疗带来新的飞跃.

7 参考文献

1 Lehrer RI, Ferrari LG, Patterson-Delafield J, Sorrell T. Fungicidal activity of rabbit alveolar and peritoneal macrophages against Candida albicans. *Infect Immun* 1980; 28: 1001-1008

2 Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707-5713

3 García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R, Forssmann WG. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J* 2001; 15: 1819-1821

4 O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999; 163: 6718-6724

5 Ganz T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 1987; 55: 568-571

6 Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 9-14

7 Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OM, Oppenheim JJ. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999; 286: 525-528

8 Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004; 53: 1658-1664

9 Fahlgren A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML. beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2004; 137: 379-385

10 Wehkamp J, Wang G, Kübler I, Nuding S, Gregorieff A, Schnabel A, Kays RJ, Fellermann K, Burk O, Schwab M, Clevers H, Bevins CL, Stange EF. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4. *J Immunol* 2007; 179: 3109-3118

11 Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR, Stange EF. Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 627-634

12 Kiehne K, Brunke G, Wegner F, Banasiewicz T, Folsch UR, Herzig KH. Defensin expression in chronic pouchitis in patients with ulcerative colitis or familial adenomatous polyposis coli. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1056-1062

13 Wehkamp J, Schwind B, Herrlinger KR, Baxmann S, Schmidt K, Duchrow M, Wohlschläger C, Feller AC, Stange EF, Fellermann K. Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1349-1355

14 Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 215-223

15 Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 1996; 381: 77-80

16 常玉英, 欧阳钦. 克罗恩病与防御素缺陷. 临床消化病杂志 2005; 17: 261-263

17 Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 460-465

18 Schmid M, Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger K, Stange EF. [The role of defensins in the pathogenesis of chronic-inflammatory bowel disease] *Z Gastroenterol* 2004; 42: 333-338

19 Wehkamp J, Schmidt K, Herrlinger KR, Baxmann S, Behling S, Wohlschläger C, Feller AC, Stange EF, Fellermann K. Defensin pattern in chronic gastritis: HBD-2 is differentially expressed with respect to Helicobacter pylori status. *J Clin Pathol* 2003; 56: 352-357

20 Hamanaka Y, Nakashima M, Wada A, Ito M, Kurazono H, Hojo H, Nakahara Y, Kohno S, Hirayama T, Sekine I. Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in Helicobacter pylori induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against Helicobacter pylori. *Gut* 2001; 49: 481-487

21 Linzmeier R, Ho CH, Hoang BV, Ganz T. A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene* 1999; 233: 205-211

22 Piers KL, Brown MH, Hancock RE. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene* 1993; 134: 7-13

23 Wang F, Fang X, Xu Z, Peng L, Cen P. Fusion expression of human beta-defensin-2 from multiple joined genes in Escherichia coli. *Prep Biochem Biotechnol* 2004; 34: 215-225

24 Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707-5713

25 陈姗, 何凤田, 董燕麟, 李蓉芬, 高会广, 陈敏, 彭家和. 人β防御素3融合蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化与活性分析. 中国生物化学与分子生物学报 2004; 20: 490-495

26 蔡绍晖, 杜军, 黄宁, 王伯瑶. 重组人β-防御素-2基因在昆虫细胞的转染表达. 四川大学学报(医学版) 2004; 35: 832-835

■同行评价

本文对防御素在未来炎症性肠病的治疗中的可能作用进行了展望, 论述条理清晰, 引用文献新, 所得结论有文献的有力支持, 是一篇有较强学术价值和可读性的综述.

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3208-3210
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

文献综述 REVIEW

激光诱发自体荧光光谱联合内镜技术在肿瘤诊断中的应用

肖 寒, 朱焯炜

■背景资料
肿瘤的早期发现对治疗有着重要的意义, 随着荧光物理学与医学相结合的交叉学科的蓬勃发展, 激光诱发自体荧光光谱联合内镜技术为肿瘤的早期发现提供了一种重要的方法. 具有灵敏、无创等优点. 本文综述了激光诱发自体荧光光谱产生的机制以及其与内镜技术相结合应用于肿瘤早期诊断的研究现状和发展.

肖寒, 无锡市第四人民医院 江苏省无锡市 214062
朱焯炜, 江南大学光信息科学与技术实验室 江苏省无锡市 214122
作者贡献分布: 肖寒与朱焯炜对此文所作贡献均等; 此文由肖寒与朱焯炜搜集、分析资料; 论文由肖寒执笔完成; 朱焯炜校对.
通讯作者: 朱焯炜, 214122, 江苏省无锡市, 江南大学光信息科学与技术实验室. yourssure@sohu.com
收稿日期: 2008-07-06 修回日期: 2008-08-28
接受日期: 2008-09-01 在线出版日期: 2008-10-08

Application of laser induced auto-fluorescence spectrum in the diagnosis of cancer

Han Xiao, Zhuo-Wei Zhu

Han Xiao, the Fourth People's Hospital of Wuxi City, Wuxi 214062, Jiangsu Province, China
Zhuo-Wei Zhu, Laboratory of Optical Information Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Dr. Han Xiao, the Fourth People's Hospital of Wuxi City, Wuxi 214062, Jiangsu Province, China. yourssure@sohu.com
Received: 2008-07-06 Revised: 2008-08-28
Accepted: 2008-09-01 Published online: 2008-10-08

Abstract
Along with the development of cross-discipline of the fluorescence (physics) and medicine, laser induced auto-fluorescence spectrum integrated with endoscopic technique became a new way to diagnose cancer in recent years. It is sensitive and non-invasive. In this review, we discuss the mechanism, clinical application and development tendency of laser induced auto-fluorescence spectrum.

Key Words: Laser induced auto-fluorescence spectrum; Endoscopic technique; Cancer diagnosis

Xiao H, Zhu ZW. Application of laser induced auto-fluorescence spectrum in the diagnosis of cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3208-3210

摘要
随着荧光物理学与医学相结合的交叉学科的蓬勃发展, 激光诱发自体荧光光谱联合内镜技术为肿瘤的早期发现提供了一种重要的方法. 他具有灵敏、无创等优点. 本文就激光诱发自体荧光光谱产生的机制以及其与内镜技术相结合应用与肿瘤诊断领域的研究现状和发展情况进行综述.

关键词: 激光诱发自体荧光光谱; 内镜技术; 肿瘤诊断

肖寒, 朱焯炜. 激光诱发自体荧光光谱联合内镜技术在肿瘤诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3208-3210
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3208.asp

■同行评议者
周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

0 引言
自1924年Policard首先在实验中观察到了肿瘤组织的自体荧光[1]以来, 荧光光谱技术在肿瘤中的应用日益发展起来. 1948年Figge *et al*观察到恶性肿瘤组织可吸收荧光物质(卟啉). 内窥镜最初从1805年以烛光作为光源的硬式直管, 经历了半可曲式内镜、纤维内镜和电子内镜, 发展至今已能深入人体各个系统的外腔、官腔内和闭合式的体腔内(如胸腔、腹腔、关节腔等)进行观察、诊断和各种疾病的治疗. 第1次将荧光光谱技术与内窥镜相结合的是Lipson, 1961年他首次采用荧光内窥镜在临床上成功识别了肿瘤组织, 此后出现了荧光物理学与医学中肿瘤学的交叉学科的蓬勃发展, 荧光光谱技术为肿瘤的早期发现提供了一种重要的方法. 目前随着激光技术、光纤技术及组织光学的发展, 体内激光诱发自体荧光光谱联合内窥镜技术在临床上得到应用.

1 肿瘤组织自体荧光光谱发生的原理
当低功率的激光照射人体组织表面, 组织中的原子或分子吸收光后会被激发到激发态, 停止激发后, 处于激发态的原子和分子通过能量驰豫过程返回基态时会发出光, 这种光叫做自体荧光. 自体荧光的光谱特征与生物组织的光学特性(吸收、放射、反射和各向异位等)有关. 由于人体不同组织的生化组成和形态结构不同, 因而不同的组织具有独特的光学特性和光谱特征. 人体

组织内有许多能发荧光的生物分子[2], 例如胶原蛋白(荧光峰: 390 nm)、弹性蛋白(荧光峰: 400 nm)、还原型辅酶Ⅰ(荧光峰: 460 nm)、黄素腺嘌呤二核苷酸(荧光峰: 520 nm)和血卟淋衍生物(荧光峰: 630 nm和680 nm)等. 各种物质荧光特性不同.

正常组织和肿瘤组织由于分化不同, 会有不同的生化成分, 或者成分相似, 但各成分比例不同, 例如, 肿瘤组织相对正常组织含较少的黄素腺嘌呤二核苷酸、原型辅酶Ⅰ和较多的血卟啉衍生物, 因此, 正常组织和肿瘤组织在受到同样条件的激发光照射时所产生的自体荧光光谱形状和强度-波长曲线不同, 因而可根据荧光光谱的差异性来区分他们. 已有许多研究表明[3-7], 肺癌组织、肠癌组织、胃癌组织都具有这种特性, 使用荧光光谱法能将他们与正常组织区别开.

2 内镜下荧光光谱技术

激光诱导荧光内镜就是将激光诱导荧光技术与内镜(如胃镜、肠镜、腹腔镜等)相结合, 在内镜检查过程中自内镜活检通道插入光导纤维, 利用一定波长的低功率激光照射正常组织与肿瘤组织[8], 诱导产生自体荧光, 并由光导纤维收集, 传输到分析仪器检测, 得到荧光光谱. 再运用各种计算方法, 如多元回归或判别分析, 对荧光光谱进行分析, 得出可靠的诊断信息.

3 激光诱发自体荧光光谱联合内镜技术在肿瘤诊断中的临床应用

早期研究者们在体外比较了正常组织和肿瘤组织的不同荧光光谱. 1982年, 曾堃 *et al*[9]报道了胃癌、肠癌等消化道肿瘤手术切除标本的荧光光谱, 他们发现, 正常组织只有在470 nm处有一高峰值, 而癌组织除了此处的高峰值外在590 nm还有一独特的峰值, 这一独特的峰值命名为癌特征峰. 丁建华 *et al*[10]也发现离体乳腺癌组织在535 nm处有高峰, 而正常组织在520 nm处有高峰.

由于体内组织与体外组织在pH和氧化状态等方面存在差异[11], 理化因素可影响光谱的结果, 所以体外光谱资料不能完全反映体内的情况. 因此研究者们将研究方向转向体内, 将荧光光谱技术与可以深入体内的内镜相结合.

Cothren *et al*[12-13]分别于1990年和1996年报道了采用激光诱发自体荧光光谱联合内镜技术诊断结肠腺瘤的体内试验结果. 通过普通白光内镜活检孔道, 利用光导纤维将激发光照射至结肠组织表面, 收集自发荧光进行研究. 研究结果显示结肠腺瘤性和非腺瘤性组织在390 nm的紫外光作为激发光时可以很好地区分开来. 1996年进行的双盲研究中, 88%的病例获得良好的鉴别诊断结果, 特异性和敏感性分别为95%和90%.

李静 *et al*[14]用石英光纤通过结肠镜活检孔进入结肠, 采用337 nm氮分子激光作激发光源, 对21例大肠癌患者进行激光诱发荧光光谱检测. 85%的患者的正常组织的主峰明显高于癌组织. 选择荧光强度(400 nm/530 nm)、主峰强度和主峰波长作为参数, 诊断大肠癌的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为85.7%、76.2%、78.3%和84.2%. 2000年, 李静 *et al*[15]又报道了以相同的激发光源, 对83例患者的大肠病变组织(包括大肠癌、腺瘤性息肉和慢性炎症)与正常组织进行自体荧光光谱检测, 得出结果, 这种方法诊断大肠癌的敏感性、特异性较高. 作者认为腺瘤性息肉的判别结果可能与组织异型增生的程度有关. 当组织异型增生程度较轻时, 光谱表现为正常, 而组织异型增生程度较重, 尤其是伴有中-重度异型增生时, 光谱表现为异常(癌), 因此他们又对15例伴有中-重度异型增生腺瘤的31条光谱进行了重点分析, 结果87.1%判别为异常(癌), 12.9%判别为正常, 说明激光诱发荧光光谱对伴有中-重度异型增生腺瘤的检出敏感性高于一般腺瘤.

体内自发体荧光光谱联合内镜检查不仅应用于消化系肿瘤, 还用于其他肿瘤. 2005年, De Velda *et al*[16]将自发荧光技术应用于口腔黏膜癌前病变的早期检查和分类. 该方法有利于口腔黏膜的病损诊断.

美国Cedars-Sinai医学中心与南加州大学的研究者[17], 研发出新式荧光光谱仪及其应用软件, 能够实时侦测出脑部组织和细胞中的生化、功能、结构上之变化. 帮助神经外科医师们, 在对脑部肿瘤进行手术与诊断时, 能更精确判断出肿瘤的位置.

4 激光诱发自体荧光光谱联合内镜技术的发展前景

内镜检查是早期肿瘤的重要手段, 但是目前普通白光内镜诊断早期肿瘤和癌前性病变的敏感性已不能满足临床要求, 荧光诊断技术和内镜的有机结合为探索肿瘤的早期诊断提供了一种全新思路和方法. 并且自体荧光诊断方法不会

■**应用要点**
目前随着激光技术、光纤技术及组织光学的发展, 体内激光诱发自体荧光光谱联合内窥镜技术在临床上得到应用.

■同行评价
本文选题新颖, 条理清楚, 对临床有一定应用价值.

损伤肿瘤组织的生理状态和正常细胞的生理功能, 是一种无侵袭性的诊断技术.

该技术属于分子水平的诊断手段, 理论上只要分子结构甚至组织结构发生改变, 自体荧光就会发生特征性改变[18], 但是在某些情况下对炎症和肿瘤的区别不能非常明确. Cothren *et al*[13]和Shomacker *et al*[19]体内研究时发现, 当炎症较重时, 黏膜增厚明显, 大部分的激发光不能穿透黏膜层到达胶原含量丰富的黏膜下层, 因此产生的荧光较弱, 出现类似于癌组织的光谱特征. 因此该项技术亦有一定的假阳性, 特别对于炎症的区分有一定难度[20-22]. 在今后的研究中需对不同炎症黏膜组织的荧光光谱进行细致分析, 以克服假阳性, 提高诊断准确率.

从目前的临床研究来看, 荧光内镜的最大优点是能发现癌前病变和提高早期癌的检出率. 应当认识到作为一项新技术, 荧光内镜还有许多尚待完善之处. 但是亦有理由相信, 随着荧光内镜系统的日益完善和对人体组织荧光产生机制及正常组织与病理组织荧光差异的根本原因的深入探讨, 荧光内镜将可能成为诊断早期肿瘤的有效手段.

5 参考文献

1 杨洪勤, 张蕾. 光动力治癌新药卟吩姆钠的研究. 国外医药合成药生化药制剂分册 1998; 19: 32-34

2 Kara M, DaCosta RS, Wilson BC, Marcon NE, Bergman J. Autofluorescence-based detection of early neoplasia in patients with Barrett's esophagus. *Dig Dis* 2004; 22: 134-141

3 王伟, 李辉, 孙玉鹗, 周乃康, 刘小兵, 李峻亨. 激光诱发自体荧光光谱区分肺癌组织和正常肺组织的研究. 解放军医学杂志 2001; 26: 149-151

4 王伟, 孙玉鹗, 周乃康, 李辉, 郑梦利, 刘小兵. 激光诱发荧光光谱诊断肺癌的初步临床研究. 中华外科杂志 2001; 39: 364-367

5 彭健, 张阳德. 大肠癌早期内镜诊断进展. 中国内镜杂志 2003; 9: 1-4

6 张阳德, 唐贵林, 刘蔚东, 彭健, 何剪太. 大肠正常组织和癌组织的显微自体荧光差异研究. 中国激光医学杂志 2001; 10: 205-209

7 张阳德, 刘蔚东, 何剪太, 万小平, 李年丰, 彭健. 大肠正常组织和癌组织自体荧光差异病理学基础. 中国内镜杂志 2000; 6: 1-3

8 Glanzmann T, Forrer M, Blant SA, Woodtli A, Grosjean P, Braichotte D, van den Bergh H, Monnier P, Wagnières G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tetra(m-hydroxyphenyl) chlorin in the hamster cheek pouch tumor model: comparison with clinical measurements. *J Photochem Photobiol B* 2000; 57: 22-32

9 曾堃, 吴金荣, 杨森, 李景唐, 朱九德, 郭孝达, 闾永芳, 叶衍铭, 金耀根. 活体组织固有荧光光谱的研究-早期粘膜型癌症诊断与治疗的新途径. 自然杂志 1982; 5: 511

10 丁建华, 余虹, 张志麟, 林钧岫. 离体乳腺正常组织、良性瘤及癌的自体荧光光谱. 应用激光 2000; 20: 38-39

11 李伟军, 郭萍, 王振华, 单健. 激光诱发自体荧光光谱在肿瘤诊断中的比较研究. 衡阳师范学院学报 2005; 3: 60-62

12 Cothren RM, Richards-Kortum R, Sivak MV Jr, Fitzmaurice M, Rava RP, Boyce GA, Doxtader M, Blackman R, Ivanc TB, Hayes GB. Gastrointestinal tissue diagnosis by laser-induced fluorescence spectroscopy at endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1990; 36: 105-111

13 Cothren RM, Sivak MV Jr, Van Dam J, Petras RE, Fitzmaurice M, Crawford JM, Wu J, Brennan JF, Rava RP, Manoharan R, Feld MS. Detection of dysplasia at colonoscopy using laser-induced fluorescence: a blinded study. *Gastrointest Endosc* 1996; 44: 168-176

14 李静, 李世荣, 曹建彪, 高革. 大肠癌组织体内激光诱发荧光光谱分析. 世界华人消化杂志 1999; 7: 164-165

15 李静, 李世荣, 高革, 曹建彪, 李雅君, 李世拥, 于波, 田玉旺. 大肠癌体内激光诱发荧光光谱分析. 中华肿瘤杂志 2000; 5: 398-400

16 De Veld DC, Witjes MJ, Sterenborg HJ, Roodenburg JL. The status of in vivo autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology. *Oral Oncol* 2005; 41: 117-131

17 Ashjian P, Elbarbary A, Zuk P, DeUgarte DA, Benhaim P, Hedrick MH. Noninvasive in situ evaluation of osteogenic differentiation by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy. *Tissue Eng* 2004; 10: 411-420

18 DaCosta RS, Andersson H, Wilson BC. Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. *Photochem Photobiol* 2003; 78: 384-392

19 Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, Flotte TJ, Richter JM, Nishioka NS, Deutsch TF. Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. *Lasers Surg Med* 1992; 12: 63-78

20 DaCosta RS, Wilson BC, Marcon NE. Light-induced fluorescence endoscopy of the gastrointestinal tract. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2000; 10: 37-69, vi

21 Messmann H, Endlicher E, Freunek G, Rümmele P, Schölmerich J, Knüchel R. Fluorescence endoscopy for the detection of low and high grade dysplasia in ulcerative colitis using systemic or local 5-aminolaevulinic acid sensitisation. *Gut* 2003; 52: 1003-1007

22 Ochsenkühn T, Tillack C, Stepp H, Diebold J, Ott SJ, Baumgartner R, Brand S, Göke B, Sackmann M. Low frequency of colorectal dysplasia in patients with long-standing inflammatory bowel disease colitis: detection by fluorescence endoscopy. *Endoscopy* 2006; 38: 477-482

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3211-3214
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

声学密度定量技术对脂肪肝变性程度的分析

沈卫东, 邹大中, 刘鹏飞, 陈宏林

沈卫东, 刘鹏飞, 东南大学附属江阴医院消化内科 江苏省江阴市 214400
邹大中, 东南大学附属江阴医院B超室 江苏省江阴市 214400
陈宏林, 南通大学护理学院 江苏省南通市 226001
江阴市科委资助项目, No. 2007-61
作者贡献分布: 此课题由沈卫东设计; 研究过程由沈卫东、邹大中、刘鹏飞与陈宏林操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈宏林提供; 数据分析由沈卫东与陈宏林完成; 论文写作由沈卫东完成.
通讯作者: 沈卫东, 214400, 江苏省江阴市寿山路163号, 东南大学附属江阴医院消化内科. shenwd2003@yahoo.com.cn
电话: 0510-86879101
收稿日期: 2008-07-15 修回日期: 2008-08-23
接受日期: 2008-08-26 在线出版日期: 2008-10-08

Acquisition densitometry for fatty liver grading

Wei-Dong Shen, Da-Zhong Zou, Peng-Fei Liu, Hong-Ling Chen

Wei-Dong Shen, Peng-Fei Liu, Department of Digestive Diseases, Affiliated Jiangyin Hospital of Southeast University, Jiangyin 214400, Jiangsu Province, China
Da-Zhong Zou, Department of Ultrasonography, Affiliated Jiangyin Hospital of Southeast University, Jiangsu 214400, China
Hong-Lin Chen, School of Nursing, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: the Foundation of Jiangyin Committee of Science and Technology, No. 2007-61
Correspondence to: Wei-Dong Shen, Department of Digestive Diseases, Affiliated Jiangyin Hospital of Southeast university, 163 Shoushan Street, Jiangyin 214400, Jiangsu Province, China. shenwd2003@yahoo.com.cn
Received: 2008-07-15 Revised: 2008-08-23
Accepted: 2008-08-26 Pubilshed online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To explore role of acquisition densitometry in determining fatty liver degeneration as well as its relationship with clinical indicators.

METHODS: Rabbit models and patients with various degrees of hepatic steatosis were measured by IBS (integrated backscatter), and its correlation to indicators regarding their weight, blood glucose, cholesterol, blood lipid, liver function and the blood flow velocity of hepatic veins and portal vein were compared and analyzed.

RESULTS: For experimental animals, hepatic AII and PPI were associated with aggravated hepatic steatosis. AII increased gradually in the near areas of rabbit liver with progressed hepatic steatosis ($P < 0.05$), but no obvious difference of AII was detected between the middle and far area of liver. PPI of the mild fatty liver in the near and far area were higher than the control group (1.95 ± 0.68 dB, 1.95 ± 0.68 dB *vs* 1.65 ± 0.50 dB, both $P < 0.05$). But there were no significant differences in PPI among the mild fatty liver, severe fatty liver and the control group. The coincidence rate of fatty liver diagnosis by ultrasonography and pathology was 89%. For the clinical research, severity grade of fatty liver was correlated to the cholesterol level and blood lipid ($P < 0.05$). And severe fatty liver was correlated to liver function and to maximum blood flow velocity of hepatic veins and portal vein ($P < 0.05$), but no correlation was detected between mild to moderate fatty liver and the liver function ($P > 0.05$).

CONCLUSION: IBS by ultrasonography in combination with liver function and bloodstream detection can reflect the grade of hepatic steatosis and serve as a reliable non-invasive tool for diagnosing fatty liver diseases.

Key Words: Fatty liver; Quantitative analysis; Integrated backscatter

Shen WD, Zou DZ, Liu PF, Chen HL. Acquisition densitometry for fatty liver grading. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3211-3214

摘要

目的: 探讨声学密度定量技术对脂肪肝变性程度分析及与临床指标的关系.

方法: 运用声学密度定量技术(肝超声背向散射积分)检测家兔及脂肪肝患者的严重程度, 并探讨与体质量、血糖、血脂、胆固醇、肝功能及肝静脉、门静脉最大血流之间的关系.

结果: 动物实验部分: 脂肪肝家兔图像平均强度(AII)和峰-峰强度(PPI)高于正常肝, 并随病变程度加重而变化. 肝近场AII值均呈递增趋

■背景资料
脂肪肝发病率日趋上升, 对脂肪肝的定量诊断, 有助于判断脂肪肝的严重程度、评价治疗效果和预后. 本研究主要探讨彩色多谱勒超声下肝脏脂肪变性定量分析的研究, 并研究其与临床指标、肝静脉、门静脉最大血流的关系.

■同行评议者
王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

■研究前沿
对于脂肪肝的诊断, 目前主要依靠B超、CT及MRI等影像学检查. 肝组织活检，创伤大, 患者一般不能接受, 临床难以普及. 对脂肪肝的严重程度, 即肝内脂肪定量分析尚缺乏有效的方法.

势(P<0.05), 中场、远场相比无明显差异; 中度脂肪肝近、远区PPI显著高于正常对照组(1.95±0.68 dB, 1.95±0.68 dB *vs* 1.65±0.50 dB, 均P<0.05), 而轻度与重度脂肪肝PPI与正常组相比无明显差异. 超声诊断与病理组织学诊断符合率为89%. 临床研究部分: 脂肪肝的严重程度与血脂水平以及胆固醇等相关(P<0.05); 同时, 重度脂肪肝还与肝功能、肝静脉、门静脉最大血流相关有关(P<0.05), 但轻中度脂肪肝未发现与肝功能水平有明显相关性.

结论: 声学密度定量技术联合检测肝功能及肝脏血流可以判断脂肪肝病变程度.

关键词: 脂肪肝; 定量分析; 背向散射积分

沈卫东, 邹大中, 刘鹏飞, 陈宏林. 声学密度定量技术对脂肪肝变性程度的分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3211–3214
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3211.asp

0 引言

肝活检组织学检查是确诊脂肪肝的金标准, 但由于易致内脏出血、胆漏而很难推广. B超、CT检查对脂肪肝的诊断具有重复性好, 灵敏度高的特点, 目前国内外都通过B超或CT进行脂肪肝的流行病学调查[1], 但对脂肪肝的严重程度, 即肝内脂肪定量分析尚缺乏有效的方法. 本研究主要探讨彩色多谱勒超声下肝脏脂肪变性定量分析的研究, 并研究其与临床指标、肝静脉、门静脉最大血流的关系, 对判断脂肪肝的严重程度、评价治疗效果和预后提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 健康家兔45只, 体质量2.5-3.0 kg, 雌雄各半, 购自南通大学动物实验中心. 本院门诊体检发现的脂肪肝患者, 共100例; 正常对照20例. 同时, 收集其身高、体质量、腰围、年龄、性别等一般资料, 并收集患者体检的肝功能、血糖、血脂、胆固醇等结果. 本研究使用的B超仪为HP5000型多普勒超声诊断仪.

1.2 方法

1.2.1 脂肪肝动物模型的建立: 将兔随机平均分成5组. 第1组为对照组, 2、3、4、5组是实验组. 实验组以含5%脂肪的混合基础饲料(95%的基础饲料+5%的猪油)分别喂养1、2、3、4 wk, 自由饮用清水. 喂养期间, 每周第1天插胃管灌注50 mL/L CCl_4石蜡油溶液5 mL, ig后, 兔进食很少, 为保证其存活, 添加少量菜叶喂养.

1.2.2 家兔脂肪肝的检测: 采用HP5000型多普勒超声诊断仪, 配备声学密度(AD)AD-IBS软件, 探头频率2-4 MHz. 家兔胸腹部脱毛, 超声观察肝后调至AD-IBS状态, ROI取样, 20×20像素圆形取样框, 系统增益设置为55, 侧向增益补偿(LGC)曲线设置前后一致, 调整时间增益补偿(TGC)曲线得到良好的IBS二维图像, 取样区分别固定于距肝右叶表面1.5-2.0 cm(近场)、2.5-3.0 cm(中场)和3.5-4.0 cm(远场), 每个部位取样3次, 描记IBS曲线并记录测定数值, 包括峰-峰强度(peak-to-peak intensity, PPI)、图像平均强度(average image intensity, AII). 检测完毕后取样家兔血清标本, 测定其体质量、肝功能、血脂、胆固醇水平. 实验组同步进行超声检测及肝穿刺组织学活检.

1.2.3 家兔脂肪肝的病理检测: 对造模成功后的家兔, 在完成超声检测后, 经耳缘静脉注入空气处死. 开腹, 迅速取出肝脏, 用生理盐水清洗, 称重, 每只兔取肝组织2块, 大小约1 cm×1 cm×1 cm, 在-18℃下进行冰冻切片, 切片厚度为9 μm, 对切片行进行苏丹Ⅳ脂肪染色、HE染色和Masson's三色染色. 光学显微镜下, 按病理学对脂肪肝的分级标准(脂滴占切片面积小于1/3为轻度脂肪肝, 1/3-2/3为中度, 大于2/3为重度), 对实验组的脂肪肝情况进行分度.

1.2.4 脂肪肝患者的检测: 将肝右叶按深度不同分为近、中、远场三等份, 距肝表面2-3 cm、5-6 cm、8-9 cm分别作为近、中、远场的代表深度. 被检者左侧卧位, 行肋缘下右肝斜切面检查, 系统增益设置为55, 同时检测患者门静脉、肝左、中、右静脉最大血流速度. 余检测方法及指标同家兔检测类似. 同时患者空腹检测肝功能、空腹血糖、血脂、胆固醇.

统计学处理 IBS值标化: 采用TGC对所测得的IBS值进行标化. 将实验采用的所有TGC值合计并计算均值, 标化IBS = 实测IBS×TGC均值/自身(所在深度)TGC值. 从而减小TGC调整对图像的影响; 所有数据均以mean±SD表示, 采用SPSS11.5统计软件进行χ^2检验、确切概率法、方差分析和相关回归分析, P<0.05为有显著性差异.

2 结果

2.1 动物实验部分 家兔脂肪肝模型基本成功, 有2只家兔分别在喂养第25、27天死亡. 家兔肝病

■相关报道
Hill *et al*对正常肝组织、脂肪肝、肝硬化等标本进行测量, 显示单位面积散射与脂肪含量正相关. 南月希 *et al*对家兔研究也表明, 超声IBS值与散射信号衰减比率可反映肝的脂肪积累和炎症病变程度.

表 1 不同程度脂肪肝AII值比较 (dB)

分组	*n*	近场	中场	远场
正常组	9	23.35 ± 1.68	24.45 ± 1.38	24.55 ± 1.68
轻度脂肪肝	9	27.33 ± 1.75[a]	24.35 ± 1.78	23.15 ± 1.68
中度脂肪肝	16	28.85 ± 2.38[a]	24.85 ± 1.69	24.68 ± 1.68
重度脂肪肝	9	31.35 ± 1.59[a]	25.26 ± 2.08	24.33 ± 1.68

[a]P<0.05 *vs* 正常组.

表 2 不同程度脂肪肝血脂、总胆固醇、ALT、AST (mean ± SD)

分组	*n*	血脂(mmol/L)	总胆固醇(mmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常组	20	1.14 ± 0.32	0.85 ± 0.35	46.3 ± 10.1	38.5 ± 10.6
轻度脂肪肝	30	1.89 ± 0.42	1.96 ± 0.45	49.7 ± 5.15	56.2 ± 11.1
中度脂肪肝	40	3.41 ± 0.54[a]	11.56 ± 1.69[a]	67.2 ± 10.3	81.5 ± 10.5
重度脂肪肝	30	6.32 ± 0.72[a]	18.54 ± 2.78[a]	98.3 ± 12.1[a]	105.4 ± 13.1[a]

[a]P<0.05 *vs* 正常组.

表 3 不同程度脂肪肝肝左、中、右静脉及门静脉最大血流速度关系比较 (cm/s)

分组	*n*	肝左静脉	肝中静脉	肝右静脉	门静脉
正常	20	16.35 ± 1.42	15.18 ± 1.51	13.54 ± 3.12	18.21 ± 1.86
轻度	30	16.68 ± 3.52	15.98 ± 4.32	13.81 ± 3.54	18.51 ± 2.95
中度	40	13.95 ± 4.15	14.21 ± 1.69	13.15 ± 2.13	14.38 ± 3.75[a]
重度	30	12.53 ± 3.18[a]	13.35 ± 2.47[a]	12.58 ± 1.65[a]	10.16 ± 1.32[a]

[a]P<0.05 *vs* 正常组.

理检查结果示, 轻、中、重度脂肪肝模型数依次为: 9、16、9只. 正常对照组家兔肝组织结构较均匀, 脂肪肝家兔AII和PPI高于正常肝, 并随病变程度加重而变化. 其中肝近场AII值均呈递增趋势(P<0.05), 其递增比例分别约为: 10-20%, 20-30%, 30-40%(表1); 而中场、远场相比无明显差异(P>0.05). 而中度脂肪肝近、远区PPI分别为1.95±0.68 dB、1.95±0.68 dB, 显著高于正常对照组PPI(1.65±0.50 dB, P<0.05), 而轻度与重度脂肪肝PPI与正常组相比无明显差异. 超声诊断与病理组织学诊断符合率为89%.

2.2 *临床研究部分* 本研究入选的100例脂肪肝患者中, 正常健康对照20例, 平均AII值为22.15±1.45 dB. 以正常组AII值为参考, AII值增高10-20%为轻度, 20-30%为中度, 30-40%为重度. 结果发现, 轻度脂肪肝患者30例, 中度40例, 重度30例, 且脂肪肝的严重程度与血脂水平以及胆固醇等相关(P<0.05); 同时, 重度脂肪肝还与肝功能水平有关(P<0.05), 但轻中度脂肪肝未发现与肝功能水平有明显相关性(表2).

2.3 *与肝左、中、右静脉及门静脉最大血流(cm/s)的关系* 随着脂肪肝程度的加重, 肝左、中、右静脉及门静脉最大血流逐渐下降, 其中, 重度脂肪肝的肝静脉及门静脉与正常组相比显著下降(P<0.05, 表3) .

3 讨论

脂肪肝是由多种疾病引起的肝内脂肪蓄积过多的一种病理状态, 病变主体在肝小叶, 以肝细胞弥漫性脂肪变性为主的临床病理综合征. 一般来讲, 当肝内脂质含量超过肝脏湿重的5%, 或组织切片光镜下每单位面积见1/3以上肝细胞有脂滴存在时, 称为脂肪肝[1-3].

本研究使用声学密度定量技术即通过测定超声背向散射积分(IBS)的方法来判断脂肪肝的严重程度. 其原理是: 背向散射信号产生的基础为组织中的细微结构, 当病变时由于组织结构的变化, 如积累的脂质、炎症细胞浸润、增生

■创新盘点
本研究通过超声下联合检测IBS值AII、PPI及肝静脉、门静脉最大血流, 并研究病理检测与超声诊断的符合率, 为定量诊断脂肪肝提供依据.

■应用要点
超声下AD技术测量IBS值、肝静脉及门静脉最大血流速度可用于脂肪肝的定量诊断, 为无创性诊断脂肪肝的病变程度、治疗评价提供了一种途径.

■同行评价
本研究对脂肪肝的临床诊断可能具有一定帮助, 学术价值一般.

的纤维组织等均可导致IBS发生改变, IBS能客观反应肝微细结构的均匀性. 轻度脂肪肝细胞内脂滴较小、数量少, 散射体的浓度、大小、排列方式等变化均不明显, 肝脏IBS无明显变化; 随着肝细胞内脂肪含量的增多, 肝细胞形态发生改变, 并发生变性、坏死, 间质内炎细胞浸润、纤维组织增生等, 均可导致散射体浓度、大小、排列方式改变, 散射体与周围组织声阻抗差发生变化, 致使IBS值增高[4-5]. 国外有学者对正常肝组织、脂肪肝、肝硬化等标本进行测量, 显示单位面积散射与脂肪含量正相关[6].

本研究结果显示, 随脂肪肝程度的加重, AII值呈现递增趋势, 表明AII可以作为判定脂肪肝程度的指标, 但以近场的差异更为明显, 其中场、远场差异无统计学差异. 其可能的机制为: 随深度加大, 由于大量散射粒子导致部分超声波被散射而不能沿原来方向前进, 信号发生衰减, 抵消了因散射体浓度增大而引起的信号增强效应. 脂肪肝轻、重度程度不同, 因此, 根据脂肪肝超声下AII衰减比率不同, 特别是近场AII值, 可判断肝脂肪病变程度. 以正常组AII值为参考, AII值增高10%-20%为轻度, 20%-30%为中度, 30%-40%为重度, IBS与病理组织学诊断符合率高达89%, 为临床无创性诊断脂肪肝提供了客观依据. 同时, 本研究也发现, 正常家兔肝不同部位PPI非常接近, 脂肪肝PPI高于正常对照组, 中度脂肪肝肝左叶近、远区与对照组间差异有显著性意义(P<0.05), 提示PPI为反映脂肪肝的病变程度. 轻、重度脂肪肝PPI高于正常对照组, 但差异无显著性意义, 提示PPI值可能与肝组织均匀程度更为有关.

本研究表明, 无论是家兔还是患者, 脂肪肝的严重程度, 与体质量指数、血脂水平、胆固醇相关. 大多数脂肪肝患者都有不同程度的总胆固醇和甘油三酯升高, 特别在重度脂肪肝患者其升高比例比较明显, 还可伴有轻度的谷丙转氨酶升高, 与其他学者研究结果相似[7-9]这可能是因为脂类在肝脏代谢障碍, 肝内甘油三酯堆积, 肝细胞肿胀变性, 受损, 血脂升高, 肝功能出现异常. 但是, 本研究也发现, 一部分轻、中度脂肪肝患者的血脂及肝功能正常, 这可能意味着高血脂是诱发脂肪肝的因素之一, 当肝功能出现异常时, 可能为脂肪肝程度在发展和加重.

本研究结果也表明, 重度脂肪肝患者的肝左、中、右静脉及门静脉血流速度明显低于正常及轻度脂肪肝患者, 与国内学者相关研究相似[10]. 这可能与随着脂肪肝程度的加重, 肝细胞内脂肪颗粒过度增加, 使肝细胞肿胀、变性, 肝窦受压, 造成入肝血流受阻, 门脉压力增加, 从而导致门脉血流速度减慢. 同样, 肝细胞的肿胀, 也可导致肝静脉变细、狭窄, 随着时间延长, 肝内纤维结缔组织增加, 肝静脉顺应性降低, 致使肝静脉血流速度减慢.

总之, 超声下AD技术测量IBS值、肝静脉及门静脉最大血流速度可用于脂肪肝的定量诊断, 且与肝细胞的病理诊断符合率较高, 并与临床指标如体质量指数、血脂、血胆固醇等相关, 为无创性诊断脂肪肝的病变程度、治疗评价提供了一种途径.

4 参考文献

1 Adams LA, Talwalkar JA. Diagnostic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40 Suppl 1: S34-S38
2 王吉耀. 脂肪肝临床流行病学. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 115-116
3 Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-1419
4 南月敏, 姚希贤, 马洪骏, 王莹, 杨林, 李凤林, 李亚. 联用高营养及酒精致家兔脂肪肝模型的病理组织学研究. 苏州大学学报(医学版) 2003; 23: 643-648
5 臧福波, 高晓军. 正常成人肝脏超声背向散射积分的测定. 中华超声影像学杂志 2001; 10: 328-330
6 Hill CR, Rivens I, Vaughan MG, ter Haar GR. Lesion development in focused ultrasound surgery: a general model. *Ultrasound Med Biol* 1994; 20: 259-269
7 潘红伟, 吕朝晖. 脂肪肝患者的超声与实验室诊断结果分析. 河南科技大学学报(医学版) 2004; 22: 131-132
8 姚希贤, 南月敏, 王莹, 李凤林, 郭瑞军. 高脂高糖、饮酒建立家兔脂肪肝模型及超声量化诊断. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1481-1486
9 陆元善. 脂肪性肝病的实验室诊断. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2116-2122
10 郝丽宁, 刘国栋. 彩超对肝脏弥漫性病变肝静脉门静脉血流检测意义. 中国超声诊断杂志 2002; 3: 263-264

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3215-3220
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

双虎清肝颗粒对四氯化碳诱发大鼠肝纤维化的防治作用

赵建学, 郭海燕, 陆玮婷, 邵 铭

赵建学, 郭海燕, 陆玮婷, 邵铭, 江苏省中医院感染性疾病科 江苏省南京市 210029
作者贡献分布: 此课题由赵建学设计; 研究过程由赵建学, 郭海燕, 陆玮婷及邵铭操作完成; 数据分析由赵建学与陆玮婷完成; 本论文写作由赵建学与郭海燕完成.
通讯作者: 赵建学, 210029, 江苏省南京市汉中路155号, 江苏省中医院感染性疾病科. zhaojx080@sina.com
电话: 025-86617147-40107 传真: 025-86618472
收稿日期: 2008-07-13 修回日期: 2008-08-20
接受日期: 2008-09-01 在线出版日期: 2008-10-08

Efficacy of Shuanghu liver-clearing granule in prevention and treatment of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats

Jian-Xue Zhao, Hai-Yan Guo, Wei-Ting Lu, Ming Shao

Jian-Xue Zhao, Hai-Yan Guo, Wei-Ting Lu, Ming Shao, Department of Infectious Diseases, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Jian-Xue Zhao, Department of Infectious Diseases, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, 155 Hanzhong Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. zhaojx080@sina.com
Received: 2008-07-13 Revised: 2008-08-20
Accepted: 2008-09-01 Published online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of Shuanghu liver-clearing granule on prevention and treatment of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats.

METHODS: Sixty Sprague-Dawley rats were divided into 6 groups, namely normal control group (group A), model group (group B), Shuanghu liver-clearing granule small-, middle-, large-dose groups (group C1, C2, C3) and silymarin control group (group D). The rats in group B, group C1, C2, C3 and group D were subcutaneously administrated with carbon tetrachloride for 8 wk. Then the rats in group C1, C2, C3 were administered with Shuanghu liver-clearing granule at different doses for 8 wk. The rats in group D were then administered with silymarin. The levels of serum HA, ⅣC, PⅢP of all rats were measured respectively under the same condition and at the same time. The pathological changes of hepatic fibrosis and the density of collagen in liver specimens of all rats were assessed using HE and Masson staining.

RESULTS: Compared with group B, lipid vacuoles and liver necrosis were significantly reduced, and false lobular formation of collagen deposition was significantly decreased in group C3 and D. There was fibrosis difference between group C1, C2, C3 and group D (12.6 ± 4.6, 10.7 ± 3.9, 6.4 ± 3.4, 6.5 ± 3.3 *vs* 16.1 ± 5.5, all $P < 0.05$). Serum HA and PⅢP levels were lower in group C3, D than in group B (161.50 ± 37.38, 185.30 ± 9.76 *vs* 292.25 ± 72.99; 18.55 ± 2.27, 17.60 ± 2.54 *vs* 33.42 ± 6.49; 19.49 ± 3.26, 25.84 ± 4.69 *vs* 36.58 ± 8.13, $P < 0.001$ or 0.05).

CONCLUSION: Shuanghu liver-clearing granule has obvious therapeutic and preventive effects on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis with a dose-effect relationship in rats.

Key Words: Rats; Hepatic Fibrosis; Shuanghu liver-clearing granule; Pharmacodynamics; Carbon Tetrachloride; Model

Zhao JX, Guo HY, Lu WT, Shao M. Efficacy of Shuanghu liver-clearing granule in prevention and treatment of carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3215-3220

摘要

目的: 探讨双虎清肝颗粒对四氯化碳诱发大鼠肝纤维化的防治作用.

方法: 清洁级SD大鼠60只, 随机分成6组: A组(正常对照组)、B组(空白模型组)、C1组(双虎清肝颗粒小剂量组)、C2组(双虎清肝颗粒中剂量组)、C3组(双虎清肝颗粒大剂量组)、D组(水飞蓟素对照组). 除空白对照组外, 其余各组大鼠均经皮下注射400 mL/L四氯化碳8 wk, 各治疗组再给予不同剂量双虎清肝颗粒干预8 wk, 阳性对照组给予水飞蓟素干预8 wk, 化学发光法检测6组大鼠血清肝纤维化指标, 取大鼠肝脏作组织病理学检查.

■背景资料
肝纤维化是肝硬化的前期阶段, 有效地阻止和缓解肝纤维化的进展将能有效地阻止肝硬化的发生. 中药复方通过活血化淤、消肿散结治疗肝纤维化已经得到广泛的认可. 中医的精髓是天人合一、辨证论治, 对于那些以湿热为主的肝纤维化患者, 如能采用清热解毒之法缓解肝纤维化, 则将为肝纤维化的治疗增加另一有效举措.

■同行评议者
陈治水, 主任医师, 中国人民解放军第二一一医院中医科

■研发前沿
伴随着新的抗病毒药物的不断问世, 业界逐渐将注意力转移到抗病毒药物的使用和各种病毒指标的血清学转换上, 忽视了肝纤维化的具体治疗措施以至错过了最佳的治疗时机. 肝纤维化分子机制研究的不断深入, 使最终治愈肝纤维化成为可能.

结果: C3、D组同B组相比, 脂质空泡明显减少, 肝细胞坏死程度明显减轻, 假小叶形成、胶原纤维沉积明显减少. C1、C2、C3和D组大鼠纤维化程度与B组比较, 有差异(12.6±4.6, 10.7±3.9, 6.4±3.4, 6.5±3.3 *vs* 16.1±5.5, 均$P<0.05$). C3、D组大鼠血清透明质酸酶(HA)、血清Ⅳ型胶原(ⅣC)及血清Ⅲ型前胶原(PⅢP)水平较B组降低(161.50±37.38, 185.30±9.76 *vs* 292.25±72.99; 18.55±2.27, 17.60±2.54 *vs* 33.42±6.49; 19.49±3.26, 25.84±4.69 *vs* 36.58±8.13, $P<0.001$或0.05).

结论: 双虎清肝颗粒能够显著改善四氯化碳所诱发的大鼠肝纤维化, 并且量效关系明显.

关键词: 大鼠; 肝损伤; 双虎清肝颗粒; 药效学; 四氯化碳; 模型

赵建学, 郭海燕, 陆玮婷, 邵铭. 双虎清肝颗粒对四氯化碳诱发大鼠肝纤维化的防治作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3215–3220

http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3215.asp

0 引言

我国属HBV感染高流行区, 一般人群的HBsAg阳性率为9.09%[1]. 慢性乙型肝炎患者中, 肝硬化失代偿的年发生率约3%, 5年累计发生率约16%[2]. 慢性乙型肝炎、代偿期和失代偿期肝硬化的5年病死率分别为0%-2%、14%-20%和70%-86%. 鉴于以上事实, 近年国内外所有慢性乙型肝炎防治指南均强调抗病毒治疗的重要性. 但在临床工作中, 由于抗病毒药物的局限性(高额费用问题、变异问题、难以停药问题、致肿瘤作用问题), 部分患者往往难以接受和坚持疗程. 近年来广泛开展了中药治疗慢性乙型肝炎的实验与临床研究[3-4], 验证了多途径、多层次、多靶点的药理学作用是中药治疗慢性乙型肝炎的综合优势. 研究发现双虎清肝颗粒[5-11]不仅具有显著改善慢性乙肝患者临床症状的作用而且具有较高的抗病毒活性, 但对其抗肝纤维化作用的研究较少. 本文拟从双虎清肝颗粒对CCl_4诱发大鼠肝纤维化模型的防治作用作一探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠: 清洁级, 东南大学实验医学动物中心提供; CCl_4: 上海新中化学厂分装; 水飞蓟素: 德国马博士大药厂生产, 批号: B0702341, 进口药品注册证号: H20060042; 双虎清肝颗粒: 中国中医科学院北京华神制药有限公司生产, 批号: 050616; 血清纤维化指标放射免疫分析试剂盒: 上海海研医学生物技术有限公司生产, 批号20071201.

1.2 方法

1.2.1 动物分组: SD大鼠60只, 体质量为180-200 g. 随机分6组, 每组10只: A组(正常对照组)、B组(空白模型组)、C1组(双虎清肝颗粒小剂量组)、C2组(双虎清肝颗粒中剂量组)、C3组(双虎清肝颗粒大剂量组)、D组(水飞蓟素对照组).

1.2.2 造模及给药方法: 除正常对照组(A组)sc花生油溶液外(2 次/wk, 每次3 mL/kg体质量), 其余5组同期造模, 在无菌条件下sc 400 mL/L CCl_4花生油溶液, 2 次/wk, 每次3 mL/kg体质量, 持续8 wk. 8 wk后A、B组大鼠仅给予正常饮食, 其余各组在正常饮食同时, C1、C2、C3组每日给予双虎清肝颗粒, 三组所用药含生药量分别为1.2 g/kg体质量、2.5 g/kg体质量和5 g/kg体质量, 稀释成不同浓度溶液5 mL后ig, 1次/d; D组给予水飞蓟素生理盐水5 mL ig, 1次/d, 剂量为50 mg/kg体质量. 连续给药8 wk后完成.

1.2.3 标本检测: 采用化学发光法按照试剂盒说明检测肝纤维化指标, 包括血清透明质酸酶(HA)、血清Ⅳ型胶原(ⅣC)、血清Ⅲ型前胶原(PⅢP); 取大鼠肝脏作常规HE染色及Masson染色并进行图像分析, 观察肝组织纤维化程度及胶原纤维百分比.

统计学处理 数据用mean±SD表示, 所有数据采用SPSS12.0软件进行分析, 不同治疗组与模型组之间比较, 定性资料采用卡方检验, 定量资料采用t检验进行统计分析, 以$P<0.05$为显著性差异, $P<0.01$为极显著差异.

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏病理表现 A组肝细胞排列整齐, 未见脂质空泡形成, 汇管区未见炎症. 肝小叶结构清晰可见, 未见肝纤维化及假小叶形成; B组可见大量脂质空泡形成, 汇管区可见大量炎性细胞浸润, 成纤维细胞大量增生, 肝细胞广泛变性呈片状坏死. 汇管区可见大量假小叶形成, 肝小叶间隔明显增宽和大量胶原纤维沉积; C1、C2、C3、D组: C1组同B组相比, 未见明显差异, 可见大量脂质空泡形成, 汇管区见大量炎性细胞浸润、成纤维细胞增生, 肝细胞广泛变性及点状、片状坏死及较多假小叶形成. C2组同模型组相比, 脂质空泡有所减少, 肝细胞坏死程度有所减轻, 假小叶形成较少, 仍明显可见、

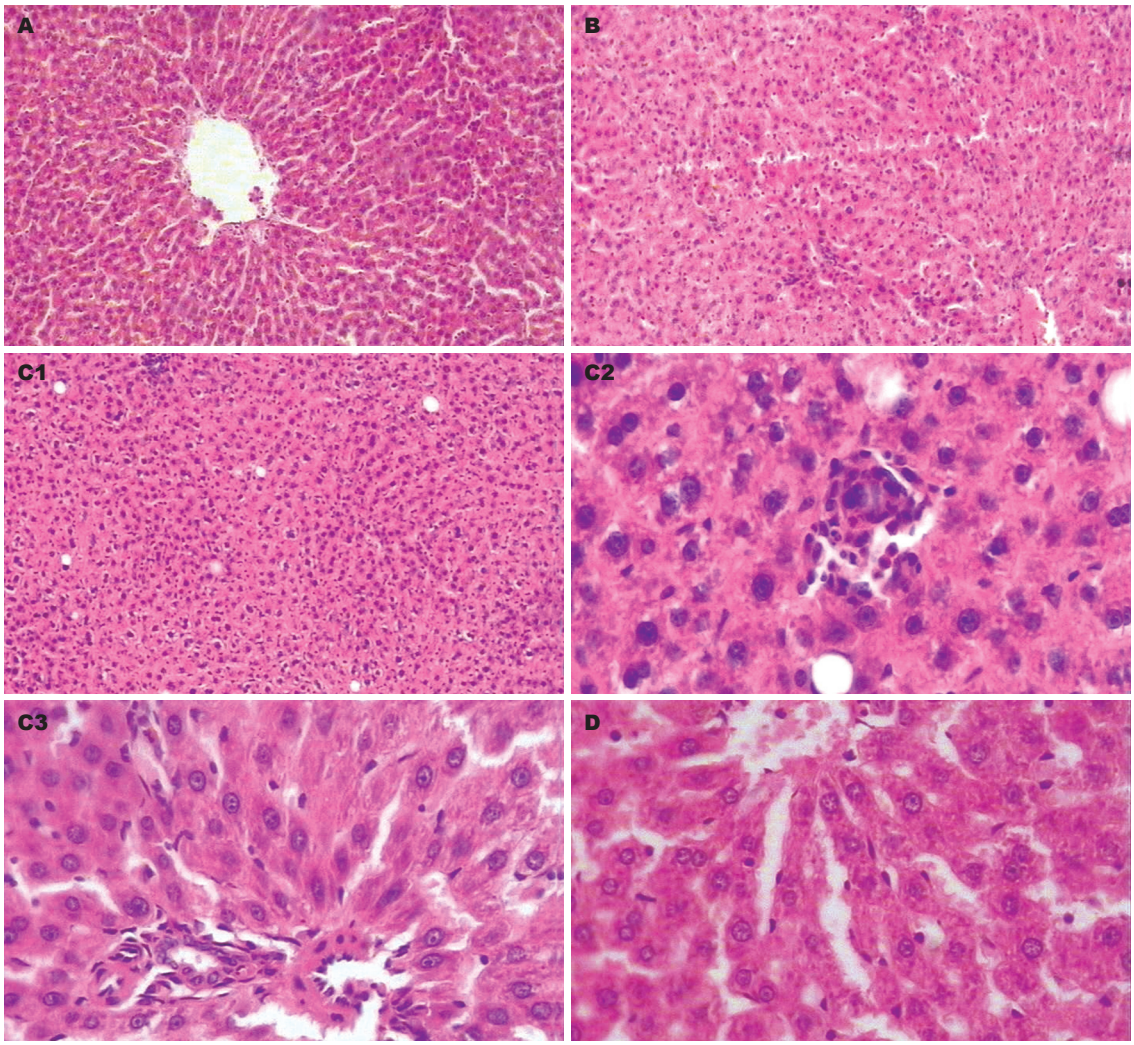


图 1 各组大鼠病理表现. A: A组; B: B组; C1−3: C1−3组; D: D组.

■相关报道
叶放认为肝纤维化的病因病机主要是湿热疫毒入侵, 而热毒瘀结是肝纤维化的中心证型, 治疗应高度重视清化瘀毒法的运用. 临床上许多慢性肝炎肝纤维化的患者, 尤其是炎症活动阶段, 即可归属于湿热瘀毒证.

较多胶原纤维沉积. C3、D组同B组相比, 脂质空泡明显减少, 肝细胞坏死程度明显减轻, 假小叶形成、胶原纤维沉积明显减少(图1).

2.2 各组大鼠肝纤维化病变半定量结果 半定量判断标准[12]见表1. A组大鼠纤维化程度为0, C1、C2、C3和D组大鼠纤维化程度与B组比较, 有差异(12.6±4.6, 10.7±3.9, 6.4±3.4, 6.5±3.3 *vs* 16.1±5.5, 均$P<0.05$). 以上数据为半定量计数结果, 计算公式: P+L+2×(PN+BN).

2.3 各组大鼠肝纤维化指标定量检测结果 C3、D组大鼠血清透明质酸酶(HA)、血清Ⅳ型胶原(ⅣC)及血清Ⅲ型前胶原(PⅢP)水平较B组降低(161.50±37.38, 185.30±9.76 *vs* 292.25±72.99; 18.55±2.27, 17.60±2.54 *vs* 33.42±6.49; 19.49±3.26, 25.84±4.69 *vs* 36.58±8.13, $P<0.001$或0.05, 表2).

3 讨论

本实验A组大鼠肝组织结构正常, 肝细胞未见变性、坏死及脂肪变性, 病理切片肝纤维化半定量计分为0; B组大鼠肝组织结构被严重破坏, 肝实质少量的纤维组织增生, 汇管区炎性细胞浸润, 肝细胞发生明显的脂肪变性, 周边区可见多量的坏死细胞, 肝静脉明显淤血, 证实炎症表现及早期肝纤维化形成, 病理切片肝纤维化半定量计分为16.1±5.5. 按照中华肝脏病学会肝纤维化学组制定的诊断标准, 两组肝组织活检肝纤维化半定量计分系统评分相差≥2分为有效, 证实造模是成功的.

余泽明 *et al*研究发现, CCl_4对肝脏的损害呈时效关系[13]. 以160 mg/kg BW CCl_4给大鼠一次性经口染毒, 在不同的时间处死的动物所造成肝脏损害的程度也不相同. 基于以上时效关系的考虑, 在本实验的设计时, CCl_4 sc 8 wk后, 经自行修复8 wk, 再与空白对照组进行大鼠的一般情况、肝脏的外观、肝纤维化指标、肝脏病理检查等方面的比较, 仍然具有可比性, 故而证明本

■应用要点
双虎清肝颗粒能够显著改善四氯化碳所诱发的大鼠肝纤维化, 并且量效关系明显.

表 1 肝纤维化半定量计分系统

计分	小叶(L)静脉周/窦周	汇管区(P)	纤维间隔	
			数量(N)	宽度(W)
0	无	无	无	–
1	局限, 少数	扩大无隔	≤6/10 mm	细
2	弥漫, 多数	扩大有隔	>6/10 mm	疏松, 宽
3	–	肝硬化	肝硬化	致密, 宽
4	–	–		≥2/3活检面积

计分: L+P+2×(N×W); 标本内仅一细纤维隔, W计分0.5; 间隔宽居二者之间者, 计分取平均值.

表 2 各组大鼠肝纤维化结果 (mean ± SD, μg/L)

	n	HA	CⅣ	PⅢP
A组	10	167.90 ± 21.67[b]	16.09 ± 4.26[b]	10.55 ± 1.37[b]
B组	8	292.25 ± 72.99	33.42 ± 6.49	36.58 ± 8.13
C1组	10	282.40 ± 41.40	27.00 ± 3.65[a]	31.78 ± 3.44
C2组	10	228.00 ± 52.24	20.95 ± 4.52	25.16 ± 3.32[a]
C3组	10	161.50 ± 37.38[b]	18.55 ± 2.27[b]	19.49 ± 3.26[b]
D组	10	185.30 ± 9.76[b]	17.60 ± 2.54[b]	25.84 ± 4.69[a]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.001$ *vs* B组.

次实验大鼠肝炎、肝纤维化模型建立的可靠性.

本实验中, C1、C2、C3组大鼠双虎清肝颗粒干预后大鼠的肝纤维化指标、病理检查结果与B组大鼠对应指标比较, 均具有显著性差异, 证实了双虎清肝颗粒具有能够改善肝脏纤维化的作用. 双虎清肝颗粒干预的三组大鼠的肝纤维化指标与水飞蓟素阳性对照组比较, 无统计学差异, 提示双虎清肝颗粒对CCl_4引起的肝纤维化的治疗作用与公认有效的水飞蓟素的治疗作用相当.

研究资料显示, CCl_4是最早、最广泛应用、最能诱导肝损害动物模型的化学毒物. 其所致肝纤维化改变与人类肝纤维化的形态特征相似, 比较适合于肝炎、肝纤维化特别是有活动性病变的慢性肝病所致肝纤维化的防治作用及其作用机制的研究. 所以国内外多采用CCl_4这一经典化学物建立肝炎、肝纤维化模型. CCl_4经肝微粒体细胞色素P450激活生成三氯化碳(CCl_3)攻击肝细胞膜的磷脂, 引起脂质过氧化, 破坏膜性结构; CCl_3还与蛋白质形成共价键, 损害线粒体还原性辅酶A(NADH)与三磷酸腺甘(ATP)在肝内生成减少, 脂肪酸氧化受到限制, 影响三羧酸循环致肝细胞“窒息”死亡; 内质网受损则脂蛋白合成障碍, 甘油三酯和脂肪酸在肝细胞内蓄积. CCl_3还可以抑制细胞膜和微粒体膜上钙泵的活性, 使Ca^{2+}内流增加, 致使肝细胞变性、坏死. 低浓度的CCl_4反复应用损害肝肾, 肝脏损害-修复-损害最终形成肝硬化.

双虎清肝颗粒由银花、虎杖、黄连、白花蛇舌草、丹参、紫花地丁、枳实、半夏、瓜蒌、蒲公英、黄芩、甘草等十二味. 本方以金银花、虎杖清热解毒、利湿活血为君, 配以白花蛇舌草、黄连、蒲公英等助其清热解毒利湿, 以枳实、半夏、瓜蒌等理气化痰, 以丹参活血化瘀, 改善微循环的作用, 同时又有激活纤溶系统, 促进纤维蛋白溶解, 降低纤维蛋白原, 抑制纤维细胞增殖和分泌, 减少胶原纤维形成和纤维组织增生, 抗纤维化的药理作用, 故重用丹参以增强活血化瘀抗纤维化为方中辅药. 诸药共奏清热解毒, 利湿化痰, 理气活血之功. 其以辛开苦降、燥湿化痰的功能为特点, 具有“专开心下苦闷”的作用, 可明显改善胃脘痞闷, 对舌苔厚腻或黄腻等痰湿中阻之证也有显著改善作用, 且其清热解毒之力较强, 善祛身目发黄.

最新研究成果表明, 该药具有以下作用: (1)抗病毒作用: 显著抑制血清中乙肝病毒DNA的复制、抑制乙肝病毒感染的原代培养肝细胞中DHBV DNA的复制、完全抑制流感病毒

甲、乙型、单纯疱疹病毒Ⅰ、Ⅱ型. (2)对CCl_4所致中毒性肝损伤者有保护作用. (3)具有调节体液免疫、细胞免疫及非特异性免疫功能的作用. 其作用的主要特点: (1)促使乙肝病毒指标HBeAg、抗-HBcIgM、HBV DNA等转阴, 对HBeAg的阴转率能达55.81%-63%. (2)有显著恢复ALT、AST、GGT、BIL等肝功能主要指标的作用. (3)可明显改善乙肝患者胸脘痞闷、口干不欲饮、恶心厌油、食少纳差、胁肋隐痛、腹部胀满、大便黏滞不爽或臭秽、身目发黄等症状及肝脾肿大、肝区叩痛、蜘蛛痣、肝掌、舌苔黄厚等症状或黄腻等体征. (4)见效快, 2 mo内获效者占66.28%, 3 mo能达86%以上. (5)严格遵循中药汤剂的理论, 进行工艺和质量的设计与控制, 是一种与汤剂作用和服法最为接近而很方便的无糖浓缩颗粒剂. (6)对人体无毒副作用, 使用安全, 获效后不易复发.

中医理论认为, 慢性肝病的病因病机及临床表现, 可将肝纤维化归属于中医学的“癥瘕”、“积聚”、“胁痛”等病证范畴, 其病机特点可归纳为“瘀、郁、虚、湿”. 从病因上看, 湿热、疫毒及多种因素造成脏腑功能失调是中医病因学的基本认识. 其治疗则可选用软坚散结、解毒、祛湿、清热、理气、益气、活血、滋肾、疏肝、柔肝、养肝等不同法则概言之, 应肝脾肾同调, 湿痰瘀同祛.

CCl_4诱导的肝纤维化动物模型在形态学、病理生理学的某些方面与人肝纤维化相似, 实验动物表现的体征及肝功能异常与人慢性肝病的临床表现接近. 造模大鼠出现饮食减少、尿黄、皮毛杂乱不洁、乏力疲软、纳差、便溏、舌质紫暗. 解剖发现肝脏呈灰白色, 肝脏质地较硬, 表面见结节样颗粒、脾脏肿大. 对CCl_4诱导的中期肝纤维化大鼠模型应辨证为血瘀脾虚证. 本方法复制的肝纤维化模型与人类肝纤维化比较从中医“证”的本质角度来看是一致的.

肝纤维化是肝硬化形成的早期阶段和必经阶段, 也是唯一在一定情况下可被逆转的阶段. 如若病因持续存在, 肝纤维化逐渐加重, 肝小叶及血管等逐渐被改建, 肝脏的正常结构遭到破坏, 中心静脉区和汇管区出现间隔、假小叶形成, 即发展为不可逆转的肝硬化. 2006年中国中西医结合学会肝病专业委员会制定的《肝纤维化中西医结合诊疗指南》指出[14]: 肝纤维化的基本证候病机为正虚血瘀, 但在肝纤维化病变不同阶段、不同患者, 可表现为不同的证候类型, 常见有肝胆湿热、肝郁脾虚、肝肾阴虚等主要证型. 在辨证治疗时, 应病证结合, 基本治法与辨证论治结合灵活运用. 国内学者围绕活血化瘀、消肿散结做了很多的研究, 但以清热解毒为主方治疗肝纤维化的研究较少[15-17]. 陈俊荣 *et al*[18]归纳了国内少数学者采用清热利湿, 清化瘀毒治疗肝纤维化的研究成果, 其理论基础与处方用药和双虎清肝颗粒治疗肝纤维化比较, 也有不同之处. 苌新明 *et al*认为[19], 目前对肝纤维化的防治存在以下误区: (1)抗病毒治疗可替代抗纤维化治疗: 抗病毒治疗可在一定程度上抑制病毒复制; (2)保肝治疗可替代抗肝纤维化治疗; (3)有肝硬化指征时再抗肝纤维化治疗; (4)动态观察, 不需治疗. 肝纤维化错综复杂的发病机制决定了抗肝纤维化治疗要立足于早用药、长程用药. 特别是对那些无抗病毒适应征或根本治疗无望的慢性病毒性肝炎患者, 要在积极保肝治疗的同时, 早期长程使用防治肝纤维化药物. 而中药多途径、多层次、多靶点的药理学作用特点恰是防治肝纤维化的优势. 双虎清肝颗粒治疗肝纤维化临床和作用的分子机制有待于进一步的研究.

■**同行评价**
本文选题新颖, 设计合理, 数据可信, 结果可靠, 结论正确, 文笔流畅, 研究内容有一定指导意义.

4 参考文献

1 梁晓峰, 陈园生, 王晓军, 贺雄, 陈丽娟, 王骏, 林长缨, 白呼群, 严俊, 崔钢, 于竞进. 中国3岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究. 中华流行病学杂志 2005; 26: 655-658

2 EASL International Consensus Conference on Hepatitis B. 13-14 September, 2002: Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version). *J Hepatol* 2003; 38: 533-540

3 韩文德. 双虎清肝颗粒治疗慢性乙型肝炎疗效观察. 中国现代医药杂志 2006; 8: 44-45

4 王兵, 朱平生. 舒肝活血化痰方干预大鼠脂肪性肝炎的实验研究. 河南中医学院学报 2005; 20: 17-19

5 舒小清. 双虎清肝颗粒合用拉米夫定治疗慢性乙型肝炎疗效观察. 白求恩军医学院学报 2006; 4: 100-101

6 张继红, 祝开荣. 双虎清肝颗粒治疗慢性乙型病毒性肝炎临床观察. 湖北中医杂志 2005; 27: 38-39

7 马次欣. 双虎清肝颗粒配合乙肝疫苗治疗慢性乙型肝炎42例. 云南中医中药杂志 2006; 27: 12

8 侯宪聚, 唐先平. 双虎清肝颗粒治疗慢性乙型肝炎206例临床观察. 中国全科医学 2007; 10: 1190-1192

9 李美英, 周丽霞, 周箐. 干扰素联合双虎清肝颗粒治疗高血压并发慢性乙型肝炎. 中西医结合心脑血管病杂志 2006; 4: 804-805

10 高丽华, 丁广谦. 双虎清肝颗粒治疗乙型肝炎60例临床观察. 光明中医 2006; 21: 80-81

11 曹宁芬, 刘娅, 焦运. 双虎清肝颗粒治疗慢性乙型肝炎观察. 实用中医药杂志 2006; 22: 360

12 中华肝脏病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识. 中华肝脏病杂志 2002; 10: 327-328

13 余明泽, 刘以农, 葛宇杰, 敬明武, 郭明. 四氯化碳对大鼠肝损伤时效关系的探讨. 现代预防医学 2005; 32:

1456-1457
14 中国中西医结合学合肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 866-870
15 王磊, 柳涛, 郑培永, 邢练军, 季光. 清肝活血方对乙醇性肝纤维化大鼠肝星形细胞和肝细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2590-2595
16 熊章鄂, 但自力, 唐望先, 严红梅. 中药肝炎平对CCl_4诱导的肝纤维化大鼠TGFβ1/Smad信号通路的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 152-157
17 徐光福, 褚月虎, 王晓阳, 田德禄, 王新月, 李澎涛, 杨晋翔, 姜良铎. 中药调肝理脾方对大鼠乙醇性肝病肝纤维化的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2386-2394
18 陈俊荣, 陈俊红, 侯振江. 抗肝纤维化中医治则的临床研究进展. 世界华人消化杂志 2008; 16: 289-291
19 苌新明, 贾皑. 注重对肝纤维化的防治. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1833-1836

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 •

世界华人消化杂志修回稿须知

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

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3221-3224
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

RANTES在肝肾联合移植排斥反应中的表达及意义

杨 芳, 江 艺, 蔡秋程, 郑智勇, 宋屿娜, 吕立志

杨芳, 江艺, 蔡秋程, 吕立志, 中国人民解放军南京军区福州总院肝胆病中心肝胆外科 福建省福州市 350025
郑智勇, 宋屿娜, 中国人民解放军南京军区福州总院病理科 福建省福州市 350025
全军"十一五"杰出人才基金资助项目, No. 06J007
作者贡献分布: 此课题由杨芳、江艺、蔡秋程及吕立志设计; 研究过程由杨芳、江艺、蔡秋程、吕立志、郑智勇及宋屿娜操作完成; 数据分析由杨芳、郑智勇及宋屿娜完成; 本论文写作由杨芳与江艺完成.
通讯作者: 江艺, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军南京军区福州总院肝胆病中心肝胆外科. jiangyi183@yahoo.com.cn
电话: 0591-22859377
收稿日期: 2008-02-19 修回日期: 2008-08-30
接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-08

Expression and significance of RANTES in rejection of combined liver-kidney transplantation in rats

Fang Yang, Yi Jiang, Qiu-Cheng Cai, Zhi-Yong Zheng, Yu-Na Song, Li-Zhi Lv

Fang Yang, Yi Jiang, Qiu-Cheng Cai, Li-Zhi Lv, Department of Hepatobiliary Surgery, FuZhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Zhi-Yong Zheng, Yu-Na Song, Department of Pathology, FuZhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China
Supported by: the Distinguished Talent Foundation of Armed Force during Eleventh-Five-Year Period, No. 06J007
Correspondence to: Dr. Yi Jiang, Department of Hepatobiliary Surgery, FuZhou General Hospital of Chinese PLA Nanjing Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. jiangyi183@yahoo.com.cn
Received: 2008-02-19 Revised: 2008-08-30
Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship between the ragulated upon activation normol T cell expressed and secreted (RANTES) and acute rejection of combined liver-kidney transplantation in rats.

METHODS: SD rats and Wistar rats were randomly divided into normal control group (group A), isograft group (group B), and allograft group (group C). The rat model of combined liver-kidney transplantation was set up uisng cuff methods. Liver and kidney biopsies from the recipients were obtained at day 1, 4, and 7 postoperatively to determine the expression level of RANTES in liver-kidney grafts. Using immunohistochemmistry staining, samples were firstly stained and then analyzed using image semiquantitive analysis.

RESULTS: At day 1, 7, 14 after transplantation, there were significant difference in expression level of RANTES between group C and group A (liver: 168.10 ± 13.62, 129.10 ± 9.04, 97.60 ± 15.16 *vs* 226.20 ± 5.73; kidney: 174.40 ± 14.23, 149.19 ± 18.88, 141.70 ± 14.95 *vs* 219.40 ± 10.70, all $P < 0.05$), and also group B (liver: 224.25 ± 12.15, 217.05 ± 15.82, 214.28 ± 12.00; kidney: 216.50 ± 13.20, 211.70 ± 11.02, 207.68 ± 15.28). Moreover, the expression level of RANTES was correlated positively to the degree of acute graft rejection.

CONCLUSION: Determination of RANTES in liver-kidney graft tissues may be helpful to the diagnosis of acute rejection and the judgment of the degree of acute rejection.

Key Words: RANTES; Combined liver and kidney transplantation; Rejection

Yang F, Jiang Y, Cai QC, Zheng ZY, Song YN, Lv LZ. Expression and significance of RANTES in rejection of combined liver-kidney transplantation in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3221-3224

摘要

目的: 探讨大鼠肝肾联合移植排斥反应中移植物RANTES的表达.

方法: 将SD、Wistar大鼠随机分为正常对照组(A组)、同种同基因移植组(B组)、同种异基因移植组(C组). 应用袖套法建立大鼠肝肾联合移植模型. 分别对A组肝肾组织及移植后1、4、7 d肝肾组织进行活检, 行免疫组化染色, 然后进行图像半定量分析, 以检测正常及移植肝肾组织中RANTES的表达水平.

结果: 移植1、4、7 d后, C组大鼠肝肾组织RANTES分子表达与A组及B组比较有差异(A组, 肝: 168.10±13.62, 129.10±9.04, 97.60±15.16 *vs* 226.20±5.73; 肾: 174.40±14.23,

■背景资料
RANTES即调节激活正常T细胞表达和分泌的细胞因子, 他属于趋化因子C-C家族(无插入其他氨基酸)中的一员. 由于趋化因子的活化部分吸引效应分子的特殊基团, 致使效应细胞向移植物募集, 导致移植排斥反应的发生.

■同行评议者
邰升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

■相关报道
近年来有研究表明趋化因子RANTES通过活化T细胞、控制免疫细胞定向迁移、向移植物内募集免疫炎性细胞，加速排斥反应.

149.19±18.88, 141.70±14.95 *vs* 219.40±10.70, 均$P<0.05$; B组, 肝: 224.25±12.15, 217.05±15.82, 214.28±12.00; 肾: 216.50±13.20, 211.70±11.02, 207.68±15.28), 且RANTES分子表达与移植术后的排斥程度呈正相关.

结论: 移植肝肾中RANTES的表达可能对诊断肝肾联合移植急性排斥及判断反应的严重程度具有参考价值.

关键词: RANTES; 肝肾联合移植; 排斥

杨芳, 江艺, 蔡秋程, 郑智勇, 宋屿娜, 吕立志. RANTES在肝肾联合移植排斥反应中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3221–3224
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3221.asp

0 引言

异体器官移植可引起复杂的炎症反应和特异性免疫应答, 该反应主要由不同的细胞因子介导, 在不用免疫抑制剂的情况下, 通常导致急性移植排斥或移植物损坏. 急性排斥反应多属于迟发性超敏反应的细胞免疫应答, 伴有体液免疫的参与, 早期病变组织内常见单个核细胞浸润. 大量炎症细胞浸润诱导了移植微血管损伤, 组织破坏, 引起移植物机能不良, 导致移植失败. 近年来有研究表明[1-2]趋化因子RANTES通过活化T细胞、控制免疫细胞定向迁移、向移植物内募集免疫炎性细胞, 加速排斥反应. RANTES的表达水平与急性排斥反应的关系, 引起国内外学者的重视. 本研究首次在肝肾联合移植领域内采用免疫组化图像半定量分析法, 检测正常、排斥及非排斥情况下大鼠肝组织中RANTES的表达水平, 以探讨其表达与肝肾联合移植急性排斥反应的关系, 旨在寻找一种及时、敏感、准确的诊断肝移植排斥反应的方法.

1 材料和方法

1.1 *材料* 成年健康近交系♂SD大鼠76只, Wistar大鼠28只, 体质量220-300 g, 由中科院上海实验动物中心提供. 兔抗人和动物RANTES pAb(武汉, Boster生物有限公司), PBS、EliVision™ plus试剂盒(福建, Maxin生物有限公司).

1.2 *方法*

1.2.1 *分组*: 实验小鼠分为A、B、C 3组: A组为正常对照组(n = 8), 均为SD大鼠, B组为同种同基因肝肾移植组(n = 24), 供受体均为SD大鼠, 为非排斥对照组; C组为同种异基因肝肾移植组(n = 24), 供体为Wistar大鼠, 受体为SD大鼠, 各24只, 为排斥组. 凡因手术失败致死或发生胆道、尿路梗阻、感染(出现症状并经细菌培养证实)等并发症者均排除在本实验分组外.

1.2.2 *造模*: 供体手术: 乙醚麻醉后, 腹部正中纵切口, 上自剑突, 下至耻骨联合, 采取多器官快速联合切取法. 先行胆管插管、右肾及右侧输尿管(带膀胱瓣)游离; 随后结扎切断结肠, 沿肠系膜根部锐性分离至肠系膜下动脉处, 暴露腹主动脉和下腔静脉. 肝素化后, 经腹主动脉予0-4℃平含肝素衡盐低压、匀速、原位灌注, 总量约为20 mL. 剪开膈肌, 于其上方剪断腹主动脉, 插管处下方剪断腹主动脉及下腔静脉, 沿脊柱前面向上锐性游离, 连同膈肌、肝、肾、胰、脾、肠道整块切取, 放入保存液中. 供体修整: 在保存液中, 贴腹主动脉根部剪断右肾动脉, 在左肾静脉根部剪断下腔静脉. 分离出肝动脉, 贴近肝门结扎、剪断. 进一步游离肝周血管、韧带后行肝上下腔静脉、门静脉、右肾下下腔静脉和右肾动脉分别行“袖套”式套管. 右肾动静脉预置血管夹阻断. 受者手术: 肝脏移植参照Harihara *et al*[3]氏三袖套法. 右肾动脉同样采用袖套法. 松开右肾动静脉的血管夹, 可见供肾颜色迅速变红, 恢复血供. 完成供体膀胱瓣与受体膀胱[4]的吻合及输尿管、肾脏的固定. 此时肝脏颜色红润, 胆汁由胆管中流出. 完成胆管吻合, 大网膜填塞胆管联结处. 生理盐水冲洗腹腔后, 留15 mL在腹中, 并倒入50 mg氨苄青霉素. 缝合腹壁切口. 去除麻醉后, 大鼠清醒翻身.

1.2.3 *标本收集*: 受体鼠在术后1, 4, 7 d分别随机抽取8只开腹取新鲜肝、肾组织, 各取一部分迅速浸入液氮中冷冻以备制作冰冻切片免疫组化染色; 另一部分用40 g/L甲醛固定以备病理检查, 以正常肝、肾组织作对照.

1.2.4 *组织病理学检查*: 将固定于甲醛中的肝肾组织制成石蜡切片, 用苏木素染色, 光镜下观察急性排斥反应, 肝肾均按Banff移植排斥诊断标准. 肝脏Banff移植排斥诊断标准[5]: 不确定:汇管区炎症浸润未达急性排斥反应诊断标准. 轻度(Ⅰ级)排斥浸润累及少数汇管区, 程度轻微, 局限在汇管区内. 中度(Ⅱ级)排斥浸润扩展至大多数或所有汇管区. 重度(Ⅲ级)同以上中度标准,浸润向汇管区周围肝实质扩散, 并有中度至重度的静脉周围炎, 伴静脉周围的肝细胞坏死. 肾脏Banff移植排斥诊断标准[6]: Ⅰ级: 中度肾间质单个核细胞浸润, 中度肾小管炎, 动脉无病变. Ⅱ级: 中度肾间质单个核细胞浸润, 重度肾小管炎

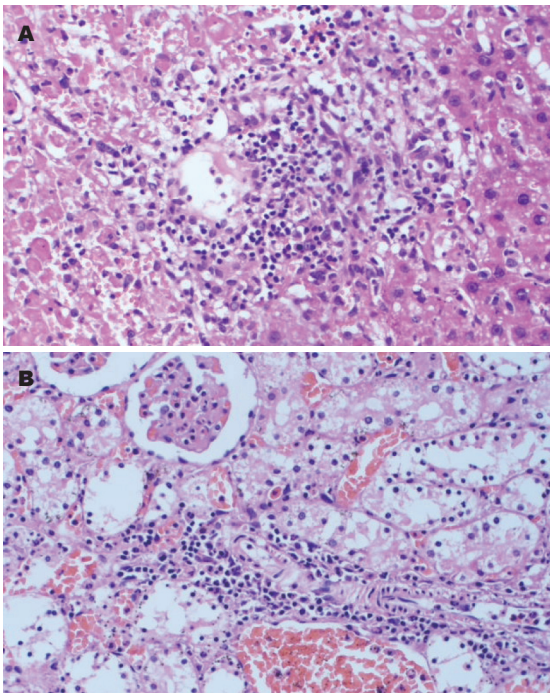


图 1 C组术后7 d肝脏重度和肾脏中度排斥反应(HE × 200). A: 肝脏重度; B: 肾脏中度.

和(或)轻至中度动脉内膜水肿, 内皮细胞肿胀、变性和脱落. III级: 严重的动脉内膜变性和水肿和(或)全层性动脉炎, 动脉壁纤维素样坏死, 梗死, 肾间质出血以及肾小管炎间质性病变.

1.2.5 移植物免疫组织化学检查(EliVision™ plus免疫组化染色法): 冰冻切片脱水和水化后, 用PBS(pH7.4)冲洗, 在高压下对组织抗原进行相应的修复. 每张切片加1滴30 g/L的过氧化氢溶液, 室温下孵育10 min, 以阻断内源性过氧化物酶活性. PBS冲洗后, 每张切片加1滴兔抗人和动物-RANTES pAb(第一抗体), 室温下孵育60 min. 每张切片加1滴聚合物增强剂(试剂A), 室温下孵育20 min. PBS冲洗. 每张切片加1滴抗兔聚合物(试剂B), 室温下孵育30 min. PBS冲洗. 每张切片加2滴新鲜配置的AEC显色液, 显微镜控制显色. 蒸馏水冲洗, 苏木素复染, 10 mL/L盐酸分化, 自来水冲洗, PBS液冲洗返蓝, 水性封片剂封片. 以PBS代替一抗为阴性对照.

1.2.6 免疫组织化学定量: 细胞质内出现棕黄色颗粒为染色阳性细胞, 每分标本在×400倍高倍镜下通过病理图像分析法比较各组间反应产物的染色深浅, 即灰度有无差异, 灰度值分为0-256级, 染色越深, 灰度值越小.

统计学处理 结果采用mean±SD表示, 采用SPSS11.5软件在微机上将资料进行统计分析. 采用单因素方差分析, 以$P<0.05$为相差显著, $P<0.01$为相差非常显著.

表 1 RANTES在移植肝肾中的表达

分组	d	肝脏	肾脏
A组	–	226.20 ± 5.73	219.40 ± 10.70
B组	1	224.25 ± 12.15	216.50 ± 13.20
	4	217.05 ± 15.82	211.70 ± 11.02
	7	214.28 ± 12.00	207.68 ± 15.28
C组	1	168.10 ± 13.62[ace]	174.40 ± 14.23[ace]
	4	129.10 ± 9.04[ace]	149.19 ± 18.88[ac]
	7	97.60 ± 15.16[ace]	141.70 ± 14.95[ac]

[a]$P<0.05$ *vs* A组; [c]$P<0.05$ *vs* B组同一天; [e]$P<0.05$ *vs* 本组其他天.

2 结果

2.1 大鼠肝肾联合移植模型 手术成功率(72 h存活率)为92%, 供体手术、血管袖套准备及受体手术时间分别为40±5.7 min、18±5.5 min和42±6.6 min, 无肝期10-14 min. 热缺血时间为0 min, 冷缺血时间为32.4 min. 3 d内的死亡原因为套管失败, 门静脉血栓形成, 气栓形成, 及供体术中出血、受体切肝时麻醉过深等. 1 wk内死亡原因为胃肠道扩张、胆漏、尿漏、输尿管梗阻等.

2.2 肝肾组织病理检查 A组和B组移植肝肾鲜见排斥反应表现. C组术后1 d肝组织中即可见小部分汇管区轻度炎症细胞浸润、静脉内皮细胞炎及胆管损伤, 为轻度排斥表现; 肾脏可见肾小管细胞空泡化, 变性, 肾小管间质少量淋巴细胞浸润, 为轻度排斥表现. 术后4 d肝组织炎症细胞浸润范围增大, 部分肝细胞坏死. 肾脏呈现肾间质单个核细胞浸润, 中重度肾小管炎, 动脉内膜肿胀、变性, 属中度排斥表现. 术后7 d肝实质与汇管区内均可见明显炎症细胞, 肝实质变性、肝细胞灶性坏死区域大, 中央静脉管壁纤维素样坏死, 炎症细胞大量浸润中央静脉, 呈重度排斥表现; 肾脏仍属中度排斥表现(图1).

2.3 免疫组化结果 RANTES在A组肝肾组织中均未见表达, B组肝组织偶见汇管区淋巴细胞微弱表达, 移植肾脏的肾小管上皮细胞及血管内膜细胞也有微弱表达, 在C组肝组织中, 移植后早期肝细胞、汇管区单核细胞、淋巴细胞和血管内皮细胞即有轻度表达, 与A、B组比较, 差异显著($P<0.05$), 且其表达水平随着天数的增加而进一步升高, 在术后7 d达到峰值, C组肾脏在移植后早期肾小管上皮细胞, 血管内皮细胞也有轻度表达, 术后4-7 d表达升高, 在系膜细胞及脱落的肾小管上皮细胞内可见明显表达增强(表1, 图2).

■创新盘点

本研究首次在肝肾联合移植领域内采用免疫组化图像半定量分析法, 检测正常、排斥及非排斥情况下大鼠肝组织中RANTES的表达水平, 以探讨其表达与肝肾联合移植急性排斥反应的关系, 旨在寻找一种及时、敏感、准确的诊断肝移植排斥反应的方法.

■同行评价
本文立题新颖, 学术价值尚可, 但方法过于简单, 观察指标单调.

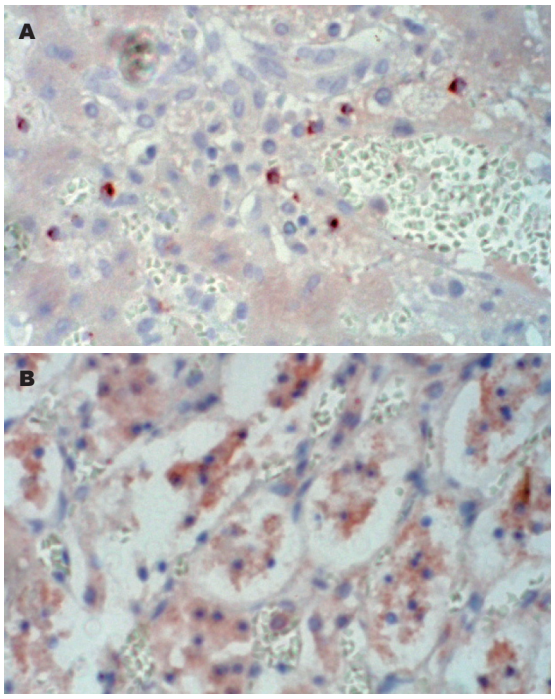


图 2 C组术后7 d移植肝脏RANTES大量度表达. A: 冰冻切片×200; B: 冰冻切片×400.

3 讨论

RANTES即调节激活正常T细胞表达和分泌的细胞因子, 他属于趋化因子C-C家族(无插入其他氨基酸)中的一员. 由于趋化因子的活化部分吸引效应分子的特殊基团, 致使效应细胞向移植物募集, 导致移植排斥反应的发生.

本次研究中, 同基因移植组大鼠移植后RANTES在肝肾均有微弱表达, 并随时间增加而轻度增加, 但总体水平不高, 考虑与升高可能与继发的缺血再灌注损伤有关[7], 因同基因移植无进一步触发免疫应答, 而未导致如排斥反应发生时的大量表达. 同种异基因组术后移植物中RANTES在排斥反应早期(术后1-3 d)呈低表达的RANTES, 4-7 d RANTES表达明显增强, 在移植肾, 主要分布于肾小管上皮细胞胞质内, 即使脱落的上皮细胞也大量阳性表达. 其次浸润的淋巴细胞、肾小球系膜细胞也均表达, 在移植肝, 肝细胞胞质中表达明显增强, 汇管区浸润的单核细胞、T淋巴细胞、嗜酸性细胞中也表达此趋化因子. 两者均差异显著, 提示RANTES表达情况可作为肝肾联合移植中监测移植肝肾肾脏排斥反应发生程度的有用指标. 考虑为早期间质中度单个核细胞浸润, RANTES由炎症组织产生并沉积于内皮, 低水平的RANTES识别并促进巨噬细胞和T细胞黏附并进入组织, 数日后T细胞持续上调RANTES的产生, 吸引更多T细胞和巨噬细胞向炎症部位聚集并进入炎症组织, 从而放大上述炎性浸润反应, 造成器官损害[8].

本次研究中, 同种异基因移植组术后肝肾的排斥程度均随着天数的增加而加重, 7 d时肝脏达Ⅲ级(重度), RANTES表达也相应增强, 而肾脏则在4-7 d达到一相对稳定排斥程度, 为Ⅱ级(中度)排斥反应, 4、7两天肾脏RANTES表达无明显差异. 考虑肝肾联合移植肾脏排斥情况较文献报道的单独肾移植的程度轻[9], 原因可能是肝脏对肾脏的保护作用[10], 其机制有待进一步探讨.

RANTES与大鼠同种异体肝肾联合移植急性排斥反应中炎性细胞向移植物浸润及排斥反应的发生呈正相关. 这也许可以用来评价和监测受者的免疫状态, 移植肝肾中RANTES的表达可能对诊断肝肾联合移植急性排斥及判断反应的严重程度具有参考价值.

4 参考文献

1 Azzawi M, Hasleton PS, Geraghty PJ, Yonan N, Krysiak P, El-Gammal A, Deiraniya AK, Hutchinson IV. RANTES chemokine expression is related to acute cardiac cellular rejection and infiltration by CD45RO T-lymphocytes and macrophages. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 881-887
2 Stojanovic T, Bedke J, Grone HJ, Proudfoot AE, Becker H, Markus P, Hecker M. Met-RANTES inhibition of mucosal perfusion failure in acute intestinal transplant rejection - role of endothelial cell-leukocyte interaction. *J Vasc Res* 2002; 39: 51-58
3 Harihara Y, Sanjo K, Otsubo O, Idezuki Y. Simplified three-cuff method in concordant hamster-to-rat liver xenotransplantation. *Transplant Proc* 1994; 26: 1191-1192
4 朱佳庚, 张炜, 钱立新, 孟小鑫. 一种大鼠肾移植模型的建立. 中华实验外科杂志 2004; 21: 103-104
5 Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997; 25: 658-663
6 Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713-723
7 Ortiz BD, Nelson PJ, Krensky AM. Switching gears during T-cell maturation: RANTES and late transcription. *Immunol Today* 1997; 18: 468-471
8 Goddard S, Williams A, Morland C, Qin S, Gladue R, Hubscher SG, Adams DH. Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. *Transplantation* 2001; 72: 1957-1967
9 Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-568
10 乔海泉, 朱预, 姜洪池, 肖毅. 胰腺和肝脏在联合移植时互惠作用的观察. 中华外科杂志 1997; 35: 749-752

编辑 李军亮 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3225-3229
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

TGFβ1对BxPC-3胰腺癌细胞周期基因表达的影响

钟 良, 陈 坚, 蒋义斌, 孙大裕

钟良, 陈坚, 蒋义斌, 孙大裕, 复旦大学附属华山医院消化科 上海市 200040
作者贡献分布: 此课题由陈坚设计; 研究过程由陈坚、钟良、蒋义斌及孙大裕共同完成; 研究所用新试剂及分析工具由钟良提供; 数据分析由陈坚完成; 本论文写作由钟良完成.
通讯作者: 陈坚, 200040, 上海市乌鲁木齐中路12号, 复旦大学附属华山医院消化科. chen5120@126.com
电话: 021-62489999-6662 传真: 021-62485501
收稿日期: 2008-04-30 修回日期: 2008-09-10
接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-08

Effect of transforming growth factor β1 on cell cycle-associated genes in BxPC-3

Liang Zhong, Jian Chen, Yi-Bin Jiang, Da-Yu Sun

Liang Zhong, Jian Chen, Yi-Bin Jiang, Da-Yu Sun, Department of Gastroenterology, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China
Correspondence to: Chen Jian, Department of Gastroenterology, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China. chen5120@126.com
Received: 2008-04-30 Revised: 2008-09-10
Accepted: 2008-09-17 Pubilshed online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To further investigate the mechanism underlying the cell cycle-associated gene expression regulated by exogeneous TGFβ1 in BxPC-3 pancreatic cancer cells.

METHODS: Alterations of 24 cell cycle-associated genes were determined using a specially designed gene chip in BxPC-3 cells treated with 2 μg/L TGFβ1 for 72 h. Those which were not interfered were taken as controls.

RESULTS: After the intervention of 2.0 μg/L TGFβ1, of the 24 genes, three genes were found unchanged, 3 genes (namely, p27KIP1, DMTF1 and TIEG) were up-regulated, 17 genes were down-regulated and only one was deleted for characterization due to an experimental error. Many a gene was associated with the G1/S cell cycle transition (e.g., GSPT1, ASK, CDK4, SKP2, cyclin C), some of them were transcription factors (e.g., E2F3 and E2F5), and TRAD was a serine/threonine kinase with Dbl- and pleckstrin homology domains.

CONCLUSION: Tissue microarray analysis revealed multiple alterations of the cell cycle-associated genes that were regulated by TGFβ1. This finding indicates the existence of cross-talking between the Smad-dependent and Smad-independent pathways of TGFβ1, which may mediate the growth-inhibitory effect of TGFβ1 in pancreatic carcinoma.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Transforming growth factor beta; Tissue microarray

Zhong L, Chen J, Jiang YB, Sun DY. Effect of transforming growth factor β1 on cell cycle-associated genes in BxPC-3. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3225-3229

摘要

目的: 通过基因芯片技术进一步研究TGFβ1调控BxPC-3胰腺癌细胞周期的机制.

方法: 采用含有24个细胞周期相关基因位点的cDNA微阵列基因芯片, 观察2.0 μg/L的TGFβ1干预BxPC-3细胞72 h后细胞周期相关基因的表达变化, 以相同培养的未加干预的BxPC-3细胞为空白对照.

结果: 加入2.0 μg/L TGFβ1干预前后, BxPC-3胰腺癌细胞系细胞周期相关基因表达有明显差异. 表达增高基因3条, 表达降低基因17条, 基本不变有3条. 仅有1条基因位点因芯片上出现负点影响分析. TGF-β1干预后, 有多个G_1期向S期转换的基因的mRNA表达发生下调, 如GSPT1、ASK、CDK4、SKP2和Cyclin C. 同时有多个转录因子的表达下调, 如E2F3和E2F5. 另外, 与丝氨酸、苏氨酸磷酸化有关的激酶也有下调, 如TRAD.

结论: 组织芯片显示TGFβ1可诱导BxPC-3细胞多种细胞周期相关基因表达变化, 提示TGFβ介导的生长抑制效应中Smad4依赖与非Smad4依赖信号通路存在串话.

关键词: 胰腺癌; 转化生长因子; 组织芯片

钟良, 陈坚, 蒋义斌, 孙大裕. TGFβ1对BxPC-3胰腺癌细胞周期基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3225-3229
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3225.asp

■背景资料
胰腺肿瘤中存在TGFβ的高表达. 外源性TGFβ对早期胰腺癌有负性生长调控作用, 但TGFβ对晚期胰腺癌有促浸润转移作用. 所涉机制尚未完全阐明.

■同行评议者
陈其奎, 教授, 中山大学附属第二医院消化内科; 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
外源性TGFβ1(1-10 μg/L)对BxPC-3胰腺癌细胞株的生长有一定抑制作用, 但胰腺癌又存在着复杂的信号通路的突变以逃逸TGFβ的生长抑制效应并不断恶性演进. 如何用现代分子生物学手段去恢复早期肿瘤对TGFβ负性生长调控的敏感性, 解除TGFβ对晚期肿瘤的促浸润转移作用. 这将是一项极有意义的研究.

0 引言

本课题组的先期研究已经证实, 外源性TGFβ1(2 μg/L)对BxPC-3胰腺癌细胞株的生长有一定抑制作用, 机制与下调CyclinD1的表达, 诱导细胞周期阻滞在G_1后期有关[1]. 但胰腺癌又存在着复杂的信号通路的突变以逃逸TGFβ的生长抑制效应并不断恶性演进[2]. 本研究拟采用含有24个细胞周期相关基因位点的cDNA微阵列基因芯片, 进一步探讨TGFβ1对BxPC-3胰腺癌细胞周期调控的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 BG600点样仪(Biorobotics公司)、FLA 3000扫描仪(Fujifilm公司)、BAS-MS 2340磷屏(Fujifilm公司)、crosslinker紫外交联仪(UVP公司)、Robbin 1000杂交炉(Robbin公司). 含有24个细胞周期相关基因的多点cDNA微阵列基因芯片由中国科学院上海细胞生物学研究所提供. 胰腺癌细胞BxPC-3(原发癌)购自中国科学院上海细胞生物研究所. 以同等培养条件下, 不加TGFβ1干预组细胞为对照组, 加2 μg/L的TGFβ1干预72 h的BxPC-3细胞为实验组. 比较两组细胞周期基因表达谱的差异.

1.2 方法

1.2.1 多点微列阵的构建: 多点cDNA阵列中所含的24个细胞周期相关基因克隆由中国科学院上海细胞生物学研究所提供. 所有cDNA克隆均在100 μL体系中扩增获得并经凝胶电泳检测质量, cDNA克隆平均长度为1000 bp, 扩增纯化后的克隆用BioRobotics点样仪将其点制在Hybond-N尼龙膜上. 每点的体积约为100 nL, 直径0.4 mm. 每个基因克隆均为双点位. 点制后置入紫外交联仪交联. 加入TGFβ1的细胞为A组, 空白对照细胞为B组, 两组杂交均重复1次. 抽提A、B两组细胞总RNA.

1.2.2 从Total RNA中分离poly+(A)mRNA: 用Qiagen公司的Oligotex mRNA midi Kit, 严格按推荐步骤操作.

1.2.3 预杂交: 实验前将预杂交液于37℃温浴至无结晶; 将10 g/L的鱼精DNA(生工)煮沸3 min, 冰上骤冷(变性); 将9 cm×24 cm的本公司的膜浸泡于6×SSC中; 向每根杂交管中加入40 mL预杂交液及600 μL已变性过的10 g/L鱼精DNA; 将浸泡于6×SSC中的膜用镊子取出; 小心卷起放入杂交管中, 尽量赶走气泡; 放入杂交炉中68℃预杂交3 h以上.

1.2.4 逆转录RT和探针标记: 取分离得到的mRNA 0.7 μg于0.5 mL EP管中, 加入(0.5 g/L)Random Primer 3 μL, 用 Rnase-free Water定溶至 20 μL; 70 C水浴3 min后冰上骤冷, 依次加入: M-MLV 5×Buffer(promega)10 μL、Rnase inhibiltor(promega) l μL、dNTP(A-)(33 mmol/L)l μL、dATP(l.5 mmol/L)l μL、M-MLV酶(promega)2 μL、33P-dATP (NEN)(50 mmol/L)15 μL, 混匀. 37℃水浴30 min后, 再42℃水浴1.5 h; 水浴结束后加1.5 μL 0.5 mol/L的NaOH, 混匀后沸水浴5-7 min, 取出冰上冷却3 min后用离心机轻甩; 再依次加入: 0.9 μL冰醋酸、10 μL 3 mol/L醋酸钠, 混匀后再加入2.5倍体积无水乙醇150 μL, 彻底混匀后加入3 μL 20 g/L的糖原, 混匀后, 15 000 *g*离心10 min. 取上清至另一EP管中, 测量沉淀管和上清管中的Counts. A组上清及沉淀的counts分别为70、110; B组上清及沉淀的counts分别为80、120. 向沉淀中加入40 μL Rnase-free水溶解, 放置待用.

1.2.5 杂交: 实验前将杂交液于37℃温浴至无结晶; 每管加入6 mL杂交液和80 μL已经变性过的10 g/L鱼精DNA, 且加入40 μL标记过的探针, 放入杂交炉中68℃杂交24 h. 杂交液配方: 5 g/L SDS、6×SSC.

1.2.6 洗膜: 从杂交管中取出杂交膜; 置于500 mL SolⅠ(5 g/L SDS、2×SSC)中, 37℃水浴摇床中轻晃5 min; 转移至500 mL SolⅡ(1 g/L SDS、2×SSC)中, 37℃水浴摇床振荡15 min; 转移至500 mL SolⅢ(5 g/L SDS、0.1×SSC)中, 37℃水浴摇床振荡1 h; 换500 mL SolⅢ(5 g/L SDS、0.1×SSC), 62℃水浴摇床振荡1 h; 清水漂洗数次, 用草纸略微吸干膜上的水流; 测量膜上残留counts为2, 根据counts确定压屏时间为5 d.

1.2.7 信号扫描分析: 使用FLA-3000A扫描仪进行图像分析, 数据处理使用Array Gauge软件. 根据扫描丰度值确定信号灰度定量. 为消除背景信号对实验信号的干扰, 以每个矩阵中的最小信号值做为本底, 每次扣除本底. 为消除实验操作对实验结果的影响, 使结果具有可比性, 使每张芯片的信号值总和相等以达到均一化. 在减去背景信号后, 各点位的放射强度在2以上时被认为是阳性信号.

2 结果

在芯片上共24个细胞周期相关基因. 加入2 μg/L TGFβ1干预前后, BxPC-3胰腺癌细胞系细胞周期相关基因表达有明显差异. 表达增高的基因3

表 1 TGFβ1干预前后BxPC-3细胞周期相关基因表达谱

clone ID	GenBank ID	Unigene ID	Gene Name	Symbol	TGF/control
HTBAVF04	X64838	Hs.31638	Restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediatefilament-associated protein)	RSN	0.52
ADBBJD02	D87953	Hs.75789	N-myc downstream regulated	NDRG1	0.53
ADBDGC09	X17644	Hs.2707	G_1 to S phase transition 1	GSPT1	0.59
HTCATB06	AB028069	Hs.152759	Activator of S phase kinase	ASK	0.61
CBDAOE02	Z82244	Hs.9482	Target of myb1 (chicken) homolog	TOM1	0.63
NPCACH06	D38550	Hs.1189	E2F transcription factor 3	E2F3	0.63
01C08	U22376	Hs.1334	V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog	MYB	0.65
GLCCHD06	U33761	Hs.334719	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	SKP2	0.65
CBDAOE02	Z82244	Hs.202833		HMOX1	0.66
					0.69
GKCGDB03	AA932233	Hs.118442	Cyclin C	CCNC	0.69
ADBDCA05	U01828	Hs.167	Microtubule-associated protein 2	MAP2	0.73
HTBATF02	M15796	Hs.78996	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	0.73
GLCBKA08	AB040450	Hs.279862	Cdk inhibitor p21 binding protein	TOK-1	0.82
GLCDLB01	AB011422	Hs.162189	Serine/threonine kinase with Dbl- and pleckstrin homology domains	TRAD	0.84
ADBBXB12	U37022	Hs.95577	Cyclin-dependent kinase 4	CDK4	0.88
ADBAJF01	AF155651	Hs.152663	p21 (CDKN1A)-activated kinase 3	PAK3	0.89
NPCBSH06	X76104	Hs.153924	Death-associated protein kinase 1	DAPK1	0.90
NPCAVF08	BE738472	Hs.2331	E2F transcription factor 5, p130-binding	E2F5	0.92
CBDAOE02	Z82244	Hs.77171	Minichromosome maintenance deficient (S. cerevisiae) 5 (cell division cycle 46)	MCM5	0.99
CBFBGB09	S81439	Hs.82173	TGFB inducible early growth response	TIEG	1.27
ADBAGH06	AF084530	Hs.5671	Cyclin D binding Myb-like transcription factor 1	DMTF1	1.32
HTCBPE01	AY004255	Hs.238990	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	CDKN1B	1.95

■**创新盘点**
本研究采用含有24个细胞周期相关基因位点的cDNA微阵列基因芯片, 研究探讨TGFβ1对BxPC-3胰腺癌细胞周期调控的机制, 尚属首次.

条, 表达降低的基因17条, 基本不变的有3条. 另有一条基因位点因芯片上出现负点, 考虑系实验误差, 故不予讨论(图1, 表1).

3 讨论

肿瘤的过度增殖与细胞周期调控因子紊乱有关, 这一观点目前已得到国内外学者的一致认同[3]. 目前认为: 在细胞周期中G_1末期向S期能否顺利过渡对于推进癌细胞周期进程具有重要意义[4], 此时细胞内相关基因表达水平发生显著的变化, 为下阶段DNA复制做好准备. 在本研究中, 我们采用了胰腺癌癌细胞株BxPC-3作为研究对象, 采用中科院研制的细胞周期基因小芯片观察了2 μg/L TGF-β1干预72 h后BxPC-3细胞细胞周期基因表达谱的改变, 取得了较理想的结果.

本实验显示, TGFβ1干预后上调的细胞周期相关基因有3条: p27KIP1(cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, CDKI 1B)、DMTF1(cyclin D binding Myb-like transcription factor 1)、TIEG(TGFB inducible early growth response). 其中上调最明显的是p27KIP1基因. p27KIP1位于染色体12p13区带, 其cDNA编码198个氨基酸残基的多肽, 分子量27 kDa. p27的结构和功能与p21及p57有许多相似之处. p27在N端的一个60个氨基酸的片段中有40%与p21一致; 同样N端有57%的氨基酸与p57相似. p27主要通过对CDK的抑制作用, 阻断G_1到S期的转换. p27主要在两个水平上起作用: 一是抑制cyclins-CDKs和H1组蛋白酶活性; 二是抑制Cyclins-CDKs复合物在Thr-160磷酸化的能力. p27对调节细胞周期、细胞的数量和大小非常重要[5]. TIEG是近年来从胰腺外分泌细胞发现的一组新颖的和Smad4相似的锌指转录因子, 包括TIEG1及TIEG2两个亚型, 可参与TGFβ的调控反应及抑制胰腺上皮细胞增殖[6]. 由于在BxPC-3中存在着TGFβ信号途径下游的Smad4/DPC4基因的纯合缺失, 故TGFβ不能诱导经典Smad4途径下游的p21waf1基因等表达, p27KIP1及TIEG转录水平的明显上调可能有一

■应用要点
对基因芯片中获得的新老差异表达基因进行进一步的功能研究和信息学分析，有助于阐明TGFβ信号通路的传导机制，尤其是Smad4依赖性与非依赖性通路之间可能存在的串话(cross talking)，发现新的细胞周期调控限制点.

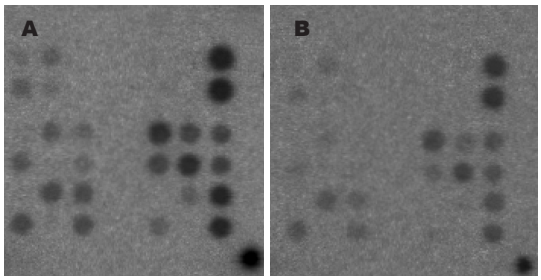


图 1 TGFβ1干预前后BxPC-3细胞周期相关基因芯片图谱. A: TGFβ1干预; B: 空白对照. 与对照相比, 信号灰度上调位点表示基因高表达; 信号灰度下调位点表示基因低表达.

定的代偿作用[7-8]，使BxPC-3同样具有一定的对TGFβ的反应性.

DMTF1(cyclin D binding Myb-like transcription factor 1)是Wnt基因调控的下游产物. Wnt信号转导途径是调控细胞形状、运动、黏附、增殖、分化、癌变及机体发育等过程的主要途径之一[9]. 目前认为Wnt通路的组成主要包括: 细胞外因子(Wnt)、跨膜受体Frizzled(Frz)、β-连环蛋白(β-catenin) 及T细胞趋化因子(tcell factor, TCF) 等一系列蛋白. 当配体Wnt蛋白与跨膜受体结合后, 能够通过激活胞质中Dsh(dishevelled)蛋白抑制GSK3β(glycogen synthase kinase 3β)的磷酸激酶活性, 拮抗β-连环蛋白的降解, 使其在胞质中大量聚集, 并进入细胞核结合TCF/LEF家族的转录因子, 从而激活下游不同靶基因如cyclin D1、c-myc等, 呈现不同的生物学效应[10]. 另外, Wnt胞内信号途径的异常激活与人类各种癌症的产生有密切联系, 由于该信号转导途径具有如此重要的作用, 因此受到研究者越来越多的重视. DMTF1作为一个新的细胞周期相关基因, 他的激活、上调提示TGFβ信号通路与Wnt信号通路间可能存在串话.

本实验显示, TGF-β1干预后, 有多个促G_1期向S期转换的基因的mRNA表达发生下调, 如GSPT1(G_1 to S phase transition 1)、ASK(activator of S phase kinase)、CDK4(cyclin-dependent kinase 4)、SKP2(S-phase kinase-associated protein 2/p45)、Cyclin C. 同时有多个转录因子的表达下调, 如E2F3(E2F transcription factor 3)、E2F5(E2F transcription factor 5, p130-binding). 另外, 与丝氨酸、苏氨酸磷酸化有关的激酶也有下调, 如TRAD(serine/threonine kinase with Dbl- and pleckstrin homology domains), 但他们在TGFβ信号通路中的分子机制仍有待深入探讨.

Restin(reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein)是本实验中下调最明显的基因, TGFβ干预组的Restin表达量仅为对照组的0.52. Restin最早发现于何杰金氏淋巴瘤的R-S细胞, 位于人染色体12q24.3, 编码160 kDa的中间丝蛋白[11]. 此后发现在间变的大细胞淋巴瘤(Ki-1淋巴瘤)中也有表达, 但正常组织中没有表达[12]. 基因转染实验证实Restin的高表达与肿瘤细胞的过度增殖有关[13]. 本研究证实Restin在Bx-PC3胰腺癌细胞中也有表达, TGFβ抑制胰腺癌细胞增殖的机制与下调Restin的表达密切相关.

NDRG家族(n-myc downstream regulated gene family) 是近几年发现的一系列和信号转导相关的分子, 他包括NDRG1、2、3、4四个成员[14]. NDRG1是在n-myc缺陷的小鼠胚胎组织中发现的一异常高表达的新基因[15]. 早期的研究显示其与细胞的增殖能力呈负相关, 在肿瘤细胞中过度表达会降低细胞的增殖速度, 促进细胞的分化, 并减弱癌细胞的转移能力, 所以可能是潜在的抑癌基因[16-18]. 但最新的结果又表明NDRG1在脑瘤、前列腺癌和肾癌等多种癌组织中高表达, 可被视为一种新的肿瘤标志物[19-20]. 已知TGFβ对早期胰腺肿瘤有生长抑制作用, 但对晚期胰腺肿瘤反而有促浸润转移作用, 表现在TGFβ1长期诱导胰腺癌细胞可发生上皮间质变(EMT)而增加其侵袭性[21]. 本研究显示TGFβ干预后, Bx-PC3细胞的NDRG1表达明显下调(仅为对照组的0.53), 这究竟是否与TGFβ1的EMT相关值得深入研究.

虽然本实验cDNA芯片检测从表达水平角度提供了有关信号传导的有用线索, 但由于基因mRNA表达后还受到基因转录后调控与蛋白表达滞后的影响, 再加上基因表达具有组织差异性、较强的时相性等, 都会给实验结果的解释带来困难. 因此我们今后将对基因芯片中差异表达基因进行进一步的功能研究和信息学分析, 以便进一步阐明TGFβ信号通路的传导机制.

4 参考文献

1 钟良, 陈坚, 徐近, 金忱, 刘懿, 张群华. TGF-β1对胰腺癌细胞BxPC-3增殖的影响及机制. 复旦学报(医学版) 2008; 35: 181-185
2 钟良, 陈坚, 徐近, 金忱, 刘懿, 张群华, 孙大裕. 胰腺癌组织中TGFβ1及其 I 型受体的表达及意义. 中华消化杂志 2008; 28: 94-97
3 Dekoj T, Lee S, Desai S, Trevino J, Babcock TA, Helton WS, Espat NJ. G2/M cell-cycle arrest and

apoptosis by n-3 fatty acids in a pancreatic cancer model. *J Surg Res* 2007; 139: 106-112
4 Goodell JR, Ougolkov AV, Hiasa H, Kaur H, Remmel R, Billadeau DD, Ferguson DM. Acridine-based agents with topoisomerase II activity inhibit pancreatic cancer cell proliferation and induce apoptosis. *J Med Chem* 2008; 51: 179-182
5 Wiseman DA, Werner SR, Crowell PL. Cell cycle arrest by the isoprenoids perillyl alcohol, geraniol, and farnesol is mediated by p21(Cip1) and p27(Kip1) in human pancreatic adenocarcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320: 1163-1170
6 Cook T, Gebelein B, Mesa K, Mladek A, Urrutia R. Molecular cloning and characterization of TIEG2 reveals a new subfamily of transforming growth factor-beta-inducible Sp1-like zinc finger-encoding genes involved in the regulation of cell growth. *J Biol Chem* 1998; 273: 25929-25936
7 Wang H, Han H, Von Hoff DD. Identification of an agent selectively targeting DPC4 (deleted in pancreatic cancer locus 4)-deficient pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9722-9730
8 Ijichi H, Otsuka M, Tateishi K, Ikenoue T, Kawakami T, Kanai F, Arakawa Y, Seki N, Shimizu K, Miyazono K, Kawabe T, Omata M. Smad4-independent regulation of p21/WAF1 by transforming growth factor-beta. *Oncogene* 2004; 23: 1043-1051
9 Li M, Becnel LS, Li W, Fisher WE, Chen C, Yao Q. Signal transduction in human pancreatic cancer: roles of transforming growth factor beta, somatostatin receptors, and other signal intermediates. *Arch Immunol Ther Exp* (Warsz) 2005; 53: 381-387
10 Chetty R, Serra S, Salahshor S, Alsaad K, Shih W, Blaszyk H, Woodgett JR, Tsao MS. Expression of Wnt-signaling pathway proteins in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: a tissue microarray analysis. *Hum Pathol* 2006; 37: 212-217
11 Delabie J, Shipman R, Brüggen J, De Strooper B, van Leuven F, Tarcsay L, Cerletti N, Odink K, Diehl V, Bilbe G. Expression of the novel intermediate filament-associated protein restin in Hodgkin's disease and anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 1992; 80: 2891-2896
12 Hilliker C, Delabie J, Speleman F, Bilbe G, Bruggen J, Van Leuven F, Van den Berghe H. Localization of the gene (RSN) coding for restin, a marker for Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease, to human chromosome band 12q24.3 and YAC cloning of the locus. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 65: 172-176
13 Delabie J, Bilbe G, Brüggen J, Van Leuven F, De Wolf-Peeters C. Restin in Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1993; 12: 21-26
14 Kim KT, Ongusaha PP, Hong YK, Kurdistani SK, Nakamura M, Lu KP, Lee SW. Function of Drg1/Rit42 in p53-dependent mitotic spindle checkpoint. *J Biol Chem* 2004; 279: 38597-38602
15 Shimono A, Okuda T, Kondoh H. N-myc-dependent repression of ndr1, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. *Mech Dev* 1999; 83: 39-52
16 Koshiji M, Kumamoto K, Morimura K, Utsumi Y, Aizawa M, Hoshino M, Ohki S, Takenoshita S, Costa M, Commes T, Piquemal D, Harris CC, Tchou-Wong KM. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 expression with clinical outcomes of colorectal cancer patients of different race/ethnicity. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2803-2810
17 Kovacevic Z, Richardson DR. The metastasis suppressor, Ndrg-1: a new ally in the fight against cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27: 2355-2366
18 Shah MA, Kemeny N, Hummer A, Drobnjak M, Motwani M, Cordon-Cardo C, Gonen M, Schwartz GK. Drg1 expression in 131 colorectal liver metastases: correlation with clinical variables and patient outcomes. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3296-3302
19 Berger P, Sirkowski EE, Scherer SS, Suter U. Expression analysis of the N-Myc downstream-regulated gene 1 indicates that myelinating Schwann cells are the primary disease target in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Neurobiol Dis* 2004; 17: 290-299
20 Tu LC, Yan X, Hood L, Lin B. Proteomics analysis of the interactome of N-myc downstream regulated gene 1 and its interactions with the androgen response program in prostate cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6: 575-588
21 封明轩, 骆明德, 费哲为, 欧敬民, 李建, 李宁. TGF-β1长期诱导胰腺癌细胞发生上皮间质变而增加其侵袭性. 现代肿瘤医学 2007; 15: 766-768

■同行评价
本文探讨TGF对胰腺癌细胞周期调控, 对于胰腺癌的治疗有指导意义, 学术价值较好.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录. 国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3230-3233
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

肝硬化患者Ghrelin、生长激素释放素的变化及其临床意义

王淑珍, 尚宏伟, 王兴翠, 李 冰, 张 斌, 丁惠国

■背景资料
正常情况下, 机体生长激素分泌受Ghrelin、生长激素释放素及生长抑素的调节. 肝硬化患者外周血生长激素水平增高, 表现为生长激素抵抗, 其原因和机制仍未完全阐明.

王淑珍, 李冰, 张斌, 丁惠国, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科 北京市 100069
尚宏伟, 王兴翠, 首都医科大学基础医学院 北京市 100069
作者贡献分布: 王淑珍负责论文撰写, ELISA测定及统计学分析; 尚宏伟与王兴翠负责免疫组织化学染色; 李冰与张斌负责内镜检查及组织活检, 丁惠国为课题负责人, 设计与论文修改.
通讯作者: 丁惠国, 100069, 北京市, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科. dinghuiguo@medmail.com.cn
电话: 010-83997155 传真: 010-63295525
收稿日期: 2008-07-14 修回日期: 2008-09-03
接受日期: 2008-09-08 在线出版日期: 2008-10-08

Levels of ghrelin, GH, GRH and their clinical significances in patients with hepatitis B related liver cirrhosis

Shu-Zhen Wang, Hong-Wei Shang, Xing-Cui Wang, Bing Li, Bin Zhang, Hui-Guo Ding

Shu-Zhen Wang, Bing Li, Bin Zhang, Hui-Guo Ding, Department of Gastroenterology and Hepatology, Beijing You'an Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China
Hong-Wei Shang, Xing-Cui Wang, Basic Science College of Capital Medical University, Beijing 100069, China
Correspondence to: Hui-Guo Ding, Department of Gastroenterology and Hepatology, Beijing You'an Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100069, China. dinghuiguo@medmail.com.cn
Received: 2008-07-14 Revised: 2008-09-03
Accepted: 2008-09-08 Published online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To investigate the relationship between serum growth hormone (GH) and ghrelin, growth releasing hormone (GRH) and its clinical significance, and to study the expression of gastric ghrelin in patients with hepatitis B-related liver cirrhosis.

METHODS: Fifty-two patients with hepatitis B-related liver cirrhosis (LC) and 17 chronic HBV-infected patients as controls were enrolled in this study. The gender and average age were comparable between LC and control patients. Fasting plasma ghrelin levels, GRH and GH were measured using ELISA. The gastric expression of ghrelin was determined using immunohistochemistry staining.

RESULTS: Plasma ghrelin levels were slightly but not significantly decreased in hepatitis B related LC patients when compared with controls. The Plasma ghrelin levels in Child C patients were significantly decreased compared with Child A patients(0.75 ± 0.479 ng/L *vs* 1.38 ± 1.064 ng/L, $P < 0.05$). The Plasma ghrelin levels showed negative but not significant correlation to plasma GH levels, and positive correlations to serum GRH ($r = 0.868$, $P < 0.001$), blood urea nitrogen, albumin and hemoglobin ($r = 0.357, 0.377, 0.367$, all $P < 0.05$) in hepatitis B related LC patients.

CONCLUSION: The increased serum growth hormone levels in hepatitis B-related liver cirrhosis patients may be related to the increased GRH. These data suggest that fasting plasma ghrelin levels may be a useful indicator reflecting malnutrition in liver cirrhosis patients.

Key Words: Ghrelin; Growth hormone; Growth hormone releasing hormone; Liver cirrhosis

Wang SZ, Shang HW, Wang XC, Li B, Zhang B, Ding HG. Levels of ghrelin, GH, GRH and their clinical significances in patients with hepatitis B related liver cirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3230-3233

摘要

目的: 研究乙型肝炎肝硬化患者血浆Ghrelin、GRH与GH关系, 观察肝硬化患者胃黏膜Ghrelin表达.

方法: 2006-06/2007-02北京佑安医院住院的乙型肝炎肝硬化患者52例, 以17例慢性乙型肝炎患者为对照. ELISA法测定血浆Ghrelin、GRH及GH浓度, 免疫组织化学方法观察胃黏膜组织中Ghrelin的表达.

结果: 乙型肝炎肝硬化组血浆Ghrelin水平与慢性乙型肝炎患者比较无明显差异. Child C级患者血浆Ghrelin水平与Child A级比较明显降低(0.75±0.479 ng/L *vs* 1.38±1.064 ng/L, $P<0.05$). Child-B级与Child-A级组无明显差异. 肝炎肝硬化患者血浆GH水平与Ghrelin呈负相关趋势, 但无统计学意义, 但是与GRH呈正相关($r = 0.868$, $P<0.001$), Ghrelin与白蛋白、总蛋白、血红蛋白呈明显正相关($r = 0.357$, 0.377, 0.367, $P<0.05$). 肝炎肝硬化患者胃黏膜

■同行评议者
刘海林, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

Ghrelin表达均不同程度阳性.

结论: 乙型肝炎肝硬化患者高GH血症与GRH增加有关, 其机制不清楚; 血浆Ghrelin水平可反映肝硬化患者营养不良状态.

关键词: Ghrelin; 生长激素; 生长激素释放素; 肝硬化

王淑珍, 尚宏伟, 王兴翠, 李冰, 张斌, 丁惠国. 肝硬化患者Ghrelin、生长激素释放素的变化及其临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3230-3233
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3230.asp

0 引言

肝硬化患者外周血生长激素(growth hormone, GH)水平增高及低蛋白血症, 表现为生长激素抵抗, 其病理生理机制仍未完全阐明[1-3]. Ghrelin是1999日本科学家Kojima *et al*在小鼠胃及下丘脑发现的由28个氨基酸组成的一种新的脑肠肽, 能促进GH的释放[4-5]. 因此我们推测, 肝硬化患者外周血GH水平增高可能受Ghrelin和生长激素释放激素(growth hormone releasing hormone, GRH)的双重调节. 本文研究乙型肝炎肝硬化患者血浆Ghrelin、GRH与GH关系, 并观察肝硬化患者胃黏膜Ghrelin表达, 拟阐明Ghrelin在肝硬化患者外周血高生长激素水平及营养不良发生机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 2006-06/2007-02北京佑安医院住院的乙型肝炎肝硬化患者52例, 男45例, 女7例, 平均年龄43岁(28-48岁). 根据Child Pugh分级分为3组: A级10例, B级21例, C级21例. 以17例慢性乙型肝炎患者为对照, 男14例, 女3例, 平均年龄38岁. 各组间年龄、性别具有可比性. 乙型肝炎肝硬化及慢性乙型肝炎的诊断符合《2005年慢性乙型肝炎防治指南》[6]. 所有患者均在晨起空腹采血5 mL, 1500 r/min×6 min, 分离血浆, -20℃保存. 患者知情同意后, 常规电子胃镜(Olympus-240, 日本)检查, 于胃体窦交界处取胃黏膜组织3块, 用40 g/L多聚甲醛液固定备用.

1.2 方法

1.2.1 血浆Ghrelin、GH及GRH的测定: 采用ELISA方法测定. 商品化的试剂盒-Ghrelin(美国Phoenix公司)、GH及GRH(美国DSL公司), 按说明书操作.

1.2.2 胃黏膜Ghrelin免疫组织化学染色: 胃黏膜组织40 g/L多聚甲醛固定, 常规酒精梯度脱水、石蜡包埋, 组织切片进行常规病理检查及S-P免疫组织化学染色. 切片经脱腊、抗原修复、封闭内源性过氧化物酶后, 加羊抗人Ghrelin多克隆抗体抗体(1∶100, 美国Phoenix公司)过夜, 滴加二抗(SP-9003试剂盒: 北京中杉金桥生物技术公司), 按说明书操作, 由病理科专家单盲判断结果.

1.2.3 血清HBV-M及肝脏生化指标测定: E170电化学发光仪(Roche)电化学发光法测定HBV-M, 试剂购自Roche公司; Olympus-AU640全自动生化分析仪常规测定ALT、AST、白蛋白、胆固醇及胆红素.

统计学处理 应用SPSS11.5统计软件进行统计分析, 计量数据用mean±SD表示, 两组间比较应用*t*检验, 多组间比较采用单因素方差分析; 相关性分析采用Linear Regression方法; $P<0.05$认为有显著性差异.

2 结果

乙型肝炎肝硬化组血浆Ghrelin水平与慢性乙型肝炎患者比较无明显差异, Ghrelin随肝硬化Child分级增加而呈下降趋势; Child C级患者血浆Ghrelin水平与Child A级比较明显降低. Child B级与Child A级组无明显差异($P>0.05$, 表1). 肝炎肝硬化患者血浆GH水平与Ghrelin呈负相关趋势, 但无统计学意义($r = -0.100$, $P = 0.478$), 但是与GRH呈正相关($r = 0.868$, $P<0.001$, 图1). 外周血Ghrelin水平与血清白蛋白、总蛋白、血红蛋白呈明显正相关, *r*值分别为0.357, 0.377, 0.367, $P<0.05$, 与其他血清生化指标无明显相关性(表2).

胃黏膜组织免疫组化显示Ghrelin表达阳性细胞散在于黏膜固有层内, 腺体内可见紫红褐色阳性染色物质, 细胞呈类圆形, 细胞较壁细胞及杯状细胞小(图2). 初步发现, 乙型肝炎肝硬化患者胃黏膜Ghrelin表达均不同程度阳性, 与慢性乙型肝炎患者胃黏膜Ghrelin表达无明显差异; 也未发现胃黏膜Ghrelin表达强度与Child分级、血浆Ghrelin水平的相关性.

3 讨论

Ghrelin是1999年日本科学家Kojima *et al*在小鼠胃内分泌细胞及下丘脑弓状核中发现的由28个氨基酸组成的多肽, 是迄今发现的唯一生长激素分泌促进激素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)的天然配体[4]. Ghrelin作为一种在人体内新发现的脑肠肽, 其病理生理意义目前尚不完全清楚. 目前研究发现, Ghrelin在促进GH的分泌、增加食欲、抗肝纤维化及调节能量、

■研发前沿
Ghrelin是新发现的脑肠肽, 在促进GH的分泌、增加食欲、抗肝纤维化、调节能量及葡萄糖代谢中具有重要作用. Ghrelin在肝炎肝硬化患者血清高生长激素水平、能量及营养不良的发生中是否也具有重要的作用呢? 与胃黏膜Ghrelin表达关系值得进一步研究.

■相关报道
近年来国外有几篇文献报道, 肝硬化患者血浆Ghrelin升高, 并与Leptin呈负相关, 与血浆尿素氮、肌酐、白细胞、C反映蛋白呈正相关. Ghrelin与糖氧化率呈负相关, 与脂肪氧化率呈正相关, 与非蛋白呼吸商呈负相关. 影响Ghrelin分泌因素复杂.

■应用要点
Ghrelin、生长激素在改善肝硬化患者营养不良中具有重要的价值，值得进一步研究.

表 1 乙型肝炎肝硬化及慢性乙型肝炎患者血浆Ghrelin、GH及GRH测定结果

分组	*n*	Ghrelin(ng/L)	GH(μg/L)	GRH(ng/L)
乙型肝炎肝硬化	52	1.02 ± 0.708	4.57 ± 5.31[b]	65.49 ± 55.35[b]
Child A	11	1.38 ± 1.064	1.44 ± 1.49	31.64 ± 17.80
Child B	21	1.06 ± 0.602	5.25 ± 6.98	66.74 ± 62.40
Child C	20	0.75 ± 0.479[d]	5.37 ± 4.00[d]	80.36 ± 54.38[d]
慢性乙型肝炎	18	1.42 ± 1.106	0.64 ± 0.64	21.08 ± 36.13

[b]P<0.001 *vs* 慢性乙型肝炎; [d]P<0.001 *vs* Child A.

表 2 Ghrelin与肝硬化患者血清生化指标及外周血常规的相关性

	Ghrelin	
	r	*P*
ALB	0.357	0.009
TP	0.377	0.008
ALT	0.260	0.165
AST	0.266	0.156
HDL	−0.064	0.737
LDL	0.099	0.603
CHO	0.121	0.429
ALP	−0.125	0.415
CHE	−0.229	0.145
TBIL	0.014	0.925
TG	0.136	0.467
Cr	0.023	0.872
BUN	−0.011	0.942
AFP	0.026	0.865
GGT	0.203	0.182
HGB	0.367	0.011
WBC	−0.140	0.338
PLT	0.057	0.699

葡萄糖代谢中具有重要作用[5,7].

影响机体Ghrelin分泌的因素及其机制仍不完全清楚. 国外学者研究发现[8-9], 肝硬化患者血浆Ghrelin升高, 与Child Pugh分级无关; 血浆Ghrelin与Leptin呈显著负相关, 与血浆尿素氮、肌酐、白细胞、C反映蛋白呈正相关. 也有学者发现[10], Ghrelin与糖氧化率呈负相关, 与脂肪氧化率呈正相关, 与非蛋白呼吸商呈负相关. 这些结果提示, 炎症反应、肾脏疾病及营养不良等因素影响机体Ghrelin的分泌. 本研究发现, 肝炎肝硬化患者血浆Ghrelin水平与白蛋白、总蛋白、血红蛋白呈明显正相关, 提示外周血Ghrelin可反映肝硬化患者营养不良状态, 与能量及物质代谢的关系仍需要进一步研究. 本研究还发现, 肝硬化Child C级患者血浆Ghrelin水平明显较Child A/B级低, 提示与肝脏损害程度呈负相关趋势. Tacke *et al*[11]发现, 肝硬化患者血浆Ghrelin显著增高, 随Ghild-Pugh积分增加, 血浆Ghrelin水平显著升高, 提示Ghrelin提示与肝脏损害程度呈正相关趋势. 而Marchesini *et al*[12]研究发现, 肝衰竭患者血浆Ghrelin水平与肝脏的严重程度及其并发症并无相关性. 本研究结果表明, 肝硬化患

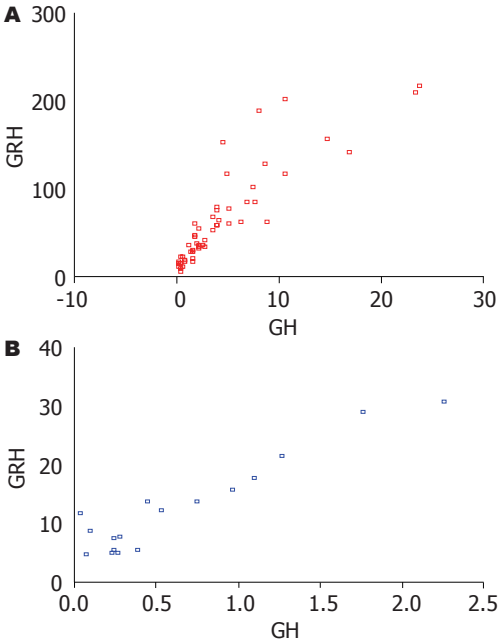


图 1 患者GH与GRH关系散点图. A: 乙型肝炎肝硬化, r = 0.876, P<0.001; B: 慢性乙型肝炎, r = 0.337, P = 0.186>0.05.

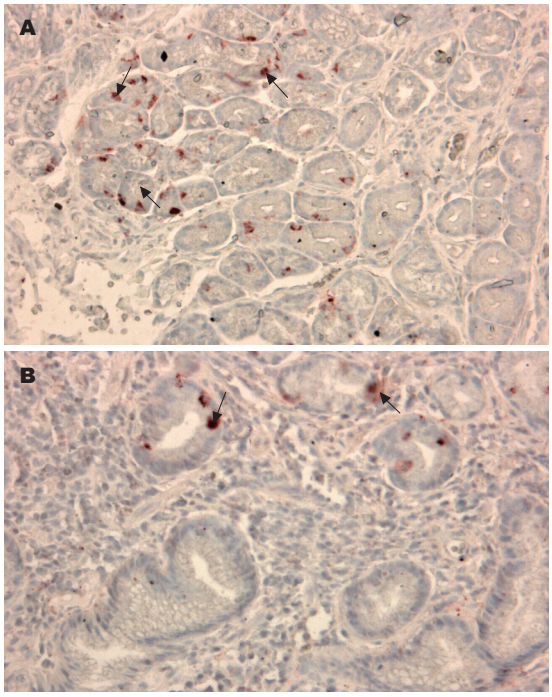


图 2 胃黏膜免疫组化显示. A: 肝硬化患者胃黏膜Ghrelin表达强阳性(×10); B: 慢性乙型肝炎患者胃黏膜Ghrelin表达阳性(×20); 箭头所指的位置.

者血浆Ghrelin随Child Pugh分级增加, Ghrelin水平呈降低趋势, 这些结果差异的原因可能与研究对象是否存在炎症反应、营养不良的程度等因素有关.

慢性肝脏疾病, 特别是肝炎肝硬化患者存在程度不同的营养不良状态, 其原因及机制十分复杂[1-3], 目前认为, 胰岛素抵抗、外周血高生长激素水平在肝硬化营养不良中具有重要作用[13], 肝硬化患者外周血生长激素水平增高的机制也不十分清楚. 那么, Ghrelin在肝炎肝硬化患者血清高生长激素水平中是否也具有重要的作用呢? 生长激素的分泌受生长激素释放激素、生长抑素、Ghrelin等调节, 并且生长激素释放激素和Ghrelin可以协同促进生长激素的分泌, 生长激素也可负反馈抑制Ghrelin的分泌[3-4]; 正常生理状态下, 生长激素与生长激素释放素也呈负反馈调节. 本研究发现, 肝炎肝硬化患者血浆生长激素与Ghrelin水平呈负相关趋势, 而与生长激素释放激素呈明显正相关. 因此我们认为, 生长激素释放激素增加是肝硬化患者血浆生长激素增加的重要因素. 肝硬化患者生长激素水平增加可能抑制了促甲状腺素释放激素的作用, 导致肝细胞生长激素受体的表达减少, 使体内生长激素的效应降低, 即生长激素抵抗. 因此, 肝硬化患者生长激素-生长激素释放素轴的负反馈作用消失或减弱, 导致肝硬化患者生长激素释放素增加, 抑或是其他机制引起生长激素释放素升高, 从而促进了腺垂体生长激素的分泌, 导致肝硬化患者血浆高生长激素状态. 近来有学者研究发现[14-16], 血浆Ghrelin降低与肥胖及超体重患者、代谢综合征等患者胰岛素敏感性降低有密切关系. Ghrelin是否对肝硬化患者胰岛素敏感性有相似的影响机制值得进一步研究.

本研究也证明, 肝硬化胃黏膜Ghrelin表达阳性细胞散在于黏膜固有层内, 腺体内可见紫红褐色阳性染色物质, 细胞呈类圆形, 细胞较壁细胞及杯状细胞小. 但是, 胃黏膜Ghrelin表达程度与肝硬化Child分级无明显关系, 与肝硬化是否存在胃黏膜病变的关系尚需要进一步研究.

因此, 乙型肝炎肝硬化患者高生长激素血症与生长激素释放素增加有关, 而与Ghrelin无明显关系, 其机制仍不清楚. 肝硬化患者血浆Ghrelin可反映其营养不良状态.

4 参考文献

1 Ding HG, Shan J, Zhang B, Ma HB, Zhou L, Jin R, Tan YF, He LX. Combined human growth hormone and lactulose for prevention and treatment of multiple organ dysfunction in patients with severe chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2981-2983

2 Conchillo M, Prieto J, Quiroga J. [Insulin-like growth factor I (IGF-I) and liver cirrhosis] *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 156-164

3 Perez R, Garcia-Fernandez M, Diaz-Sanchez M, Puche JE, Delgado G, Conchillo M, Muntani J, Castilla-Cortazar I. Mitochondrial protection by low doses of insulin-like growth factor- I in experimental cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2731-2739

4 Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660

5 Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4908-4911

6 中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华传染病杂志 2005; 23: 421-431

7 Iseri SO, Sener G, Saglam B, Ercan F, Gedik N, Yegen BC. Ghrelin alleviates biliary obstruction-induced chronic hepatic injury in rats. *Regul Pept* 2008; 146: 73-79

8 Ataseven H, Bahcecioglu IH, Kuzu N, Yalniz M, Celebi S, Erensoy A, Ustundag B. The levels of ghrelin, leptin, TNF-alpha, and IL-6 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma due to HBV and HDV infection. *Mediators Inflamm* 2006; 2006: 78380

9 Takahashi H, Kato A, Onodera K, Suzuki K. Fasting plasma ghrelin levels reflect malnutrition state in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2006; 34: 117-123

10 Kalaitzakis E, Bosaeus I, Ohman L, Bjornsson E. Altered postprandial glucose, insulin, leptin, and ghrelin in liver cirrhosis: correlations with energy intake and resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 808-815

11 Tacke F, Brabant G, Kruck E, Horn R, Schoffski P, Hecker H, Manns MP, Trautwein C. Ghrelin in chronic liver disease. *J Hepatol* 2003; 38: 447-454

12 Marchesini G, Bianchi G, Lucidi P, Villanova N, Zoli M, De Feo P. Plasma ghrelin concentrations, food intake, and anorexia in liver failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2136-2141

13 范春蕾, 吴燕京, 丁惠国, 张斌, 董培玲, 周莉, 平春霞, 赵春惠. 慢性重型病毒性肝炎的能量代谢及糖、蛋白质、脂肪氧化. 中国临床营养杂志 2006; 14: 110-114

14 Maffeis C, Bonadonna RC, Consolaro A, Vettor R, Banzato C, Silvagni D, Bogoni G, Pellegrino M, Tato L. Ghrelin, insulin sensitivity and postprandial glucose disposal in overweight and obese children. *Eur J Endocrinol* 2006; 154: 61-68

15 Barazzoni R, Zanetti M, Ferreira C, Vinci P, Pirulli A, Mucci M, Dore F, Fonda M, Ciocchi B, Cattin L, Guarnieri G. Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3935-3940

16 Barazzoni R, Zanetti M, Stulle M, Mucci MP, Pirulli A, Dore F, Panzetta G, Vasile A, Biolo G, Guarnieri G. Higher total ghrelin levels are associated with higher insulin-mediated glucose disposal in non-diabetic maintenance hemodialysis patients. *Clin Nutr* 2008; 27: 142-149

■同行评价

本研究设计合理, 结果可信, 具有一定的学术价值.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3234-3237
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

内镜下胆道支架置入术治疗恶性胆道梗阻122例

黄晓东, 范 彦, 张 姮, 刘文敏, 刘小明

■背景资料
胆管恶性梗阻引起的进行性加重的黄疸和脏器损伤, 可严重影响患者的生活质量, 并可迅速加快病情的发展, 所以引流胆汁以减轻或解除黄疸是非常重要的治疗措施. 内镜下胆道支架置入术由于其安全简便, 恢复了胆汁的生理流向, 无胆汁丢失之虞, 术后也无需特殊护理, 疗效确切, 能提高患者的生活质量, 延长患者生存期, 对恶性胆管梗阻患者不失为一种较好的姑息性治疗手段.

■同行评议者
张国梁, 主任医师, 天津市第一中心医院消化内科

黄晓东, 范彦, 张姮, 刘文敏, 刘小明, 武汉市中心医院消化内科 湖北省武汉市 430014
作者贡献分布: 此课题由黄晓东设计; 研究过程由黄晓东, 范彦, 张姮, 刘文敏及刘小明操作完成; 数据分析由范彦完成; 本论文写作由黄晓东与范彦完成.
通讯作者: 黄晓东, 430014, 湖北省武汉市中心医院消化内科. huangxiaodong88@163.com
电话: 027-82811080
收稿日期: 2008-07-24 修回日期: 2008-08-26
接受日期: 2008-09-01 在线出版日期: 2008-10-08

Endoscopic retrograde biliary drainage for 122 patients with malignant biliary obstruction

Xiao-Dong Huang, Yan Fan, Heng Zhang, Wen-Min Liu, Xiao-Ming Liu

Xiao-Dong Huang, Yan Fan, Heng Zhang, Wen-Min Liu, Xiao-Ming Liu, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China
Correspondence to: Xiao-Dong Huang, Department of Gastroenterology, the Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, Hubei Province, China. huangxiaodong88@163.com
Received: 2008-07-24 Revised: 2008-08-26
Accepted: 2008-09-01 Published online: 2008-10-08

Abstract
AIM: To investigate the clinical application of endoscopic retrograde biliary drainage (ERCP) in malignant biliary obstruction.

METHODS: A total of 122 patients with malignant biliary obstruction, from July 2003 to December 2007, underwent insertion of plastic and/or metal stents endoscopically. The total bilirubin was compared in preoperative and postoperative serum.

RESULTS: A total of 122 patients with malignant biliary obstruction underwent ERCP 138 times with 128 times of successful stent insertion. The success rate of stent insertion was 92.75%. Jaundice was improved in 96.88% of the patients with a significant reduction of serum bilirubin. Post-drainage complication rate was 7.97%. A total of 108 patients with satisfactory results were followed up. And 86 of 108 patients died in follow-up (Survival time: 7.14 ± 5.13 mo), while 22 patients still survive up to now. The median survival time of all patients was 7.2 months.

CONCLUSION: Biliary stent insertion has high successful rate and reliable efficacy in releasing jaundice, and can improve the life quality of patients with malignant biliary obstruction.

Key Words: Malignant biliary obstruction; Stent; Endoscopy; Endoscopic retrograde biliary drainage

Huang XD, Fan Y, Zhang H, Liu WM, Liu XM. Endoscopic retrograde biliary drainage for 122 patients with malignant biliary obstruction. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3234-3237

摘要
目的: 探讨经内镜逆行胰胆管造影技术(ERCP)在恶性胆道梗阻中的应用.

方法: 收集2003-07/2007-12临床确诊为恶性胆道梗阻患者122例, 均采用ERCP及留置内支架, 比较手术前后血清总胆红素变化情况.

结果: 全组122例胆管恶性梗阻中, 行ERCP操作138例次, 置管成功128例次, 操作成功率92.75%. 消除黄疸总有效率96.88%, 并发症发生率为7.97%. 108例置管成功且治疗有效者全部跟踪随访, 其中86例在随访期内死亡, 存活期为7.14±5.13 mo, 22例至今仍存活, 全组生存中位时间7.2 mo.

结论: 胆道支架置入术治疗恶性梗阻性黄疸疗效确切, 安全性高, 能提高患者生活质量.

关键词: 恶性胆道梗阻; 支架; 内镜; 内镜下胆道支架置入术

黄晓东, 范彦, 张姮, 刘文敏, 刘小明. 内镜下胆道支架置入术治疗恶性胆道梗阻122例. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3234-3237
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3234.asp

0 引言
一般恶性胆管梗阻发现时往往已失去手术根治的机会, 而药物治疗的效果是十分有限的, 但是

胆管恶性梗阻引起的进行性加重的黄疸和脏器损伤, 可严重影响患者的生活质量, 并可迅速加快病情的发展, 所以引流胆汁以减轻或解除黄疸是非常重要的治疗措施. 以往多采用行胆肠吻合术或PTCD[1]置管引流等治疗, 但手术风险大, 创伤大, 并发症多, 而PTCD也因有一定创伤性, 导管易脱落, 引流范围较局限, 胆汁丢失体外, 临床护理麻烦等缺陷, 临床应用受到限制. 自1979年Soehendra *et al*首次报道经内镜放置胆道内支架成功后, 内镜下胆道支架置入术(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)由于其安全简便, 恢复了胆汁的生理流向, 无胆汁丢失之虞, 术后也无需特殊护理, 疗效确切, 能提高患者的生活质量, 延长患者生存期, 对恶性胆管梗阻患者不失为一种较好的姑息性治疗手段. 我院自2003年以来成功放置胆道支架治疗恶性胆管梗阻128例次, 取得了良好的疗效. 现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-07-2007-08, 共有122例临床确诊为恶性胆管梗阻、且不能或不愿接受外科治疗的患者在我科行内镜下胆道支架置入术, 男68例, 女54例, 年龄38-86(平均68.63)岁. 本组患者均有中至重度黄疸, 血清总胆红素73.80-483.50(平均225.13±119.51) μmol/L, 直接胆红素55.70-356.30(平均147.03±82.1) μmol/L, 29例伴有全身皮肤瘙痒, 72例伴不同程度的腹痛, 16例伴有陶土样大便, 36例伴体质量减轻, 8例发热. 所有病例在放置支架前均进行B超、CT或MRI、MRCP等影像学检查, 明确胆管扩张范围及梗阻部位, 并对梗阻原因做出临床诊断, 本组中, 胆管癌47例, 胰头癌59例, 肝癌侵犯胆管5例, 胆囊癌侵犯胆管3例, 壶腹癌8例.

1.2 方法 内镜采用日本Olympus公司TJF-140R十二指肠镜. 常规ERCP术前准备, 先行胆管插管, 待导丝越过梗阻段后注入适量30%泛影葡胺造影, 了解胆管狭窄部位、程度及长度, 导丝超选至扩张最显著、引流范围最广泛的胆管, 胆管狭窄较严重者先行胆道扩张, 选择合适的扩张器进行狭窄段扩张, 再根据病情及患者意愿选择不同的治疗方法: 塑料支架引流(endoscopic retrograde biliary drainage, ERBD)、金属支架引流(endoscopic metal biliary endoprothesis, EMBE)或联合引流.

所有病例在手术后观察体温、腹痛、恶心、呕吐等症状及腹部体征, 于术后3、12、24 h复查血清淀粉酶和血白细胞, 术后7、14 d复查肝功能, 根据手术前后总胆红素(TBIL)下降情况判断减黄效果, 标准如下: (1)满意: 黄疸迅速消退, 1 wk内TBIL下降1/3以上, 或2 wk内降至50 μmol/L 以下; (2)一般: 黄疸有所下降, 1 wk内TBIL下降不足1/3, 或2 wk内未降至50 μmol/L以下; (3)无效: 黄疸下降不明显甚至上升.

所有置管成功者均电话随访黄疸控制及生存情况, 若再次出现黄疸和(或)不明原因发热, 考虑支架阻塞, 再次行ERCP, 放置塑料支架者则更换支架, 放置金属支架者则在金属支架中央再放置一根塑料支架.

统计学处理 采用非参数乘积限估计法(Kaplan-Meier法)作出存活率曲线.

2 结果

2.1 置管成功率 全组122例胆管恶性梗阻中, 行ERCP操作138例次, 置管成功128例次. 塑料支架组18例, 均8.5F“圣诞树”塑料支架, 其中9例为先放置金属支架, 因支架阻塞后在原支架中央重新置入1根塑料支架. 金属支架组105例, 其中7例为先放置塑料支架, 于支架阻塞后取出塑料支架更换为金属支架者, 均为非带膜金属支架. 5例为联合引流, 亦均为2根8.5F“圣诞树”塑料支架. 10例置管未成功, 故全组置管成功率92.75%.

2.2 疗效 治疗后观察患者128例次, 其中疗效满意组114例, 占89.06%; 一般组10例, 占7.81%; 无效组4例, 占3.13%, 总有效率(满意组加一般组)96.88%(表1).

2.3 并发症 全组术后发生高淀粉酶血症9例、轻度胰腺炎2例, 无出血、穿孔、急性胆管炎及死亡, 故全组与操作有关的并发症发生率7.97%(11/138), 均予以抗炎、抑酶对症等治疗, 3-5 d恢复正常.

2.4 随访情况 对108例置管成功且治疗有效者者全部跟踪随访, 随访期为2003-08/2008-03, 其中86例在随访期内死亡, 存活期为7.14±5.13 mo, 22例至今仍存活, 全组生存中位时间7.2 mo(图1). ERBD组18例, 支架通畅期85.2±17.4 d, 支架阻塞率50%(9/18). EMBE组105例, 支架通畅期207.9±36.4 d, 支架阻塞率11.43%(12/105). 联合引流组5例, 支架通畅期126.5±15.7 d, 支架阻塞率20%(1/5).

3 讨论

胆道内支架置入术主要用于治疗胆管局限性良

■研发前沿
胆道内支架置入术主要用于治疗胆管局限性良恶性狭窄, 尤其适用于中晚期难以手术治愈以及高龄患者, 为一种姑息性治疗手段, 着重于胆管系统的再通, 减轻黄疸, 提高患者生活质量. 根据Schulz制定的ERCP难度分级, 胆道内支架置入术属于复杂的ERCP治疗, 而难度级别越高, 成功率越低, 并发症的发生率则高.

■创新盘点
本文发现内镜下胆道支架置入术是一种创伤小, 并发症少, 成功率高, 适应范围广, 可反复应用的姑息性治疗手段, 对恶性梗阻性黄疸患者可有效解除梗阻, 减轻患者痛苦,可提高生存质量, 延长生命.

■应用要点
本文总结内镜技术治疗恶性梗阻性黄疸, 有助于临床医生进一步治疗此疾病.

表 1 128例次患者内镜治疗方法与疗效的关系

治疗方法	n	满意		一般		无效	
		n	%	n	%	n	%
ERBD	18	12	66.7	4	22.2	2	11.1
EMBE	105	98	93.3	5	4.8	2	1.9
联合引流	5	4	80	1	20	0	0
合计	128	114	89.06	10	7.81	4	3.13

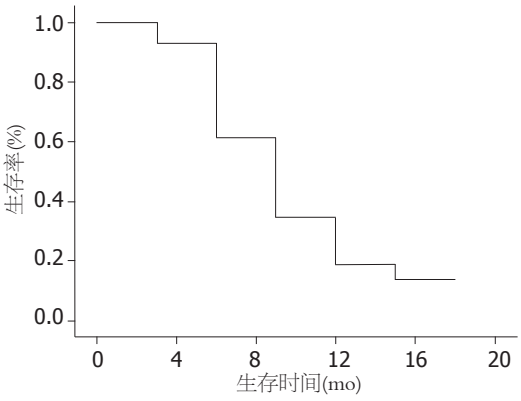


图 1 108例胆管恶性梗阻患者的生存曲线.

恶性狭窄, 尤其适用于中晚期难以手术治愈以及高龄患者, 为一种姑息性治疗手段, 着重于胆管系统的再通, 减轻黄疸, 提高患者生活质量. 多年来我科应用该技术成功地在内镜下对122例胆管恶性梗阻患者进行了姑息性治疗, 支架置入成功率92.75%, 总有效率96.88%, 与Dinkel *et al*[2]报道相近, 早期并发症为7.97%, 无一人因手术死亡. 综合来看有以下几方面的体会: (1)病例选择及术前准备: 一般而言, 内镜下胆道引流术具有较开腹手术和PTCD更广的适应证范围, 通常不受年龄的限制, 有少量腹水和肝功能变化合并轻度凝血功能下降的患者仍可谨慎实施, 心肺肝肾功能衰竭或有上消化道梗阻, 内镜不能进入十二指肠者应视为禁忌. 术前除心电图、血常规、肝功能、出凝血时间等, 应常规行MRCP检查[3], 了解肿瘤侵犯部位、范围以及受累胆管的分布, 从而为内镜引流提供方向, 尤其是准备一侧引流的时候, 术前的MRCP对引流侧的选择有着重要的意义. (2)支架的选择: 塑料支架价格便宜, 可取出、多次更换, 近期疗效尚可[4], 其最大缺陷是支架置入后, 经一段时间的引流容易为胆泥或肿瘤坏死组织等阻塞, 造成引流失效. 近年来, 国内外有报道[5-7]内镜直视下同期置入多点位支架治疗胆管恶性梗阻, 取得较好的临床疗效, 本组资料亦说明联合引流的支架通畅期明显高于单侧引流, 且减黄效果亦明显好于单侧引流. 故对对肝门部Bismuth-Ⅱ型以上, 左右肝管或二级以上分支已不交通, 条件许可同期放置两根塑料支架. 金属支架由于其口径大, 金属材料光洁度较高, 细菌和胆泥物质不宜黏附, 不宜发生阻塞和移位, 引流效果和通畅期限均明显优于塑料支架, 完全置于胆管内的支架还保留了乳头括约肌的功能, 减少了返流感染的机会. 国内外许多学者的研究均已证实这一点[8-10], 故对于经济条件许可, 引流胆系丰富, 估计引流效果理想, 无其他重要器官功能障碍, 预计生存期3 mo以上的患者可置入金属支架. (3)并发症: 包括早期并发症及晚期并发症, 早期并发症有出血、穿孔、胰腺炎或高淀粉酶血症、胆管炎等[11-12], 晚期并发症有支架的阻塞、移位、滑脱, 甚至有报告因支架移位而损伤肠道引起穿孔[13]. 出血多于行乳头括约肌切开术时因”跳跃性”切开而发生, 操作时要防止快速而不加控制拉锯式地切开. 穿孔多因切开过长或操作粗暴所至, 小的穿孔可内科保守治疗, 如有脓肿形成, 则应转外科治疗, 大的穿孔应立即手术治疗. 本组无一例出血、穿孔及胆管炎, 但并发高淀粉酶血症9例、轻度胰腺炎2例, 合占7.97%, 均予以抗炎、抑酶对症等治疗, 3-5 d恢复正常, 考虑发生原因与插管时间过长, 反复插管损伤乳头, 乳头灼伤, 注射造影剂有关, 因此我们的体会是: 操作时应尽量少用造影剂, 并且压力不要过高, 在导丝通过狭窄段后, 高频电刀跟进, 再造影, 放置支架前尽量将造影剂抽出, 如有乳头水肿, 行EST可能会减少胰腺炎的发生[12]. 置放的支架可因肿瘤压迫或胆泥、肿瘤坏死组织堵塞, 塑料支架堵塞后可以更换新的支架, 金属支架堵塞后可以用气囊清除支架内坏死物, 或在原支架中央重新置入一根支架. 本组中7例患者成功放置塑料支架, 且临床退黄有效, 在平均85.2±17.4 d后支架全部阻塞, 均更换为金属支架. 有12例患者放置金属支架后堵塞,

支架阻塞率11.435%, 低于国外文献报道[14-15], 其中9例用气囊清除支架内坏死物, 并在原支架中央重新置入一根塑料支架后, 黄疸、发热等症状缓解, 3例因肿瘤广泛侵犯十二指肠及胃窦而行PTCD.

总之, 内镜下胆道支架置入术是一种创伤小, 并发症少, 成功率高, 适应范围广, 可反复应用的姑息性治疗手段, 对恶性梗阻性黄疸患者可有效解除梗阻, 减轻患者痛苦, 虽对肿瘤并无直接治疗作用, 但可提高生存质量, 延长生命.

4 参考文献

1 刘岩, 杨光, 于友涛. 经皮肝穿刺胆道支架置放结合动脉化疗栓塞治疗恶性梗阻性黄疸. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1495-1497

2 Dinkel HP, Triller J. [Primary and long-term success of percutaneous biliary metallic endoprotheses (Wallstents) in malignant obstructive jaundice] *Rofo* 2001; 173: 1072-1078

3 孙晓伟, 王霄英, 皱英华, 蒋学祥. 梗阻性黄疸患者MRCP及肝胆断层MR检查对于PTC及PTBD指导作用的分析. 中国医学影像技术 2005; 21: 375-377

4 雷宇峰, 刘变英. 内镜下胆管内、外引流术治疗梗阻性黄疸. 世界华人消化杂志 2002; 10: 1474-1475

5 李兆申, 许国铭, 孙振兴, 邹多武, 邹晓平, 金震东. 胆胰管良恶性梗阻的双支架联合引流. 中华消化内镜杂志 2002; 19: 15-17

6 刘鹏, 周会新, 龚彪, 胡冰. 胆胰管良恶性梗阻的多点位引流治疗. 中国内镜杂志 2007; 13: 1259-1262

7 王拥军, 冀明, 俞力, 牛应林, 张澍田. 肝门部胆管恶性梗阻双支架引流22例临床应用. 中国实用内科杂志 2006; 28: 1148-1150

8 Hoepffner N, Foerster EC, Högemann B, Domschke W. Long-term experience in Wallstent therapy for malignant choledochal stenosis. *Endoscopy* 1994; 26: 597-602

9 Huibregtse K, Carr-Locke DL, Cremer M, Domschke W, Fockens P, Foerster E, Hagenmüller F, Hatfield AR, Lefebvre JF, Liquory CL. Biliary stent occlusion--a problem solved with self-expanding metal stents? European Wallstent Study Group. *Endoscopy* 1992; 24: 391-394

10 Davids PH, Groen AK, Rauws EA, Tytgat GN, Huibregtse K. Randomised trial of self-expanding metal stents versus polyethylene stents for distal malignant biliary obstruction. *Lancet* 1992; 340: 1488-1492

11 叶丽萍, 许国铭, 孙振兴, 李兆申. 诊断与治疗性逆行胰胆管造影并发胰腺炎危险因素分析. 中华消化杂志 2001; 5: 284-286

12 Hatzidakis AA, Tsetis D, Chrysou E, Sanidas E, Petrakis J, Gourtsoyiannis NC. Nitinol stents for palliative treatment of malignant obstructive jaundice: should we stent the sphincter of Oddi in every case? *Cardiovasc Intervent Radiol* 2001; 24: 245-248

13 张建生, 张月寒, 康喜荣. 胆总管猪尾形内支架引流致十二指肠穿孔1例. 中国内镜杂志 2004; 10: 60

14 Kim HS, Lee DK, Kim HG, Park JJ, Park SH, Kim JH, Yoo BM, Roe IH, Moon YS, Myung SJ. Features of malignant biliary obstruction affecting the patency of metallic stents: a multicenter study. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 359-365

15 Cheng JL, Bruno MJ, Bergman JJ, Rauws EA, Tytgat GN, Huibregtse K. Endoscopic palliation of patients with biliary obstruction caused by nonresectable hilar cholangiocarcinoma: efficacy of self-expandable metallic Wallstents. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 33-39

■同行评价
本文选题能够准确地反映特定内容, 临床资料较全, 例数较多, 有一定的说服力.

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 •

世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

本刊讯 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策, 具体格式如: (1)作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成. (2)同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3238-3241
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

结直肠癌淋巴结的分期

彭开勤, 邵永胜, 张应天, 吴文良, 刘 文

■背景资料
AJCC/UICC的TNM分期对评估结直肠癌的预后和指导综合治疗的价值虽得共识, 但对结直肠癌手术标本中局部淋巴结最少应检查多少枚, 每枚淋巴结作几张切片检查, 并无明文规定. 而且, 其N分期单以淋巴结转移≥4枚定为N_2也较笼统而不够精确.

彭开勤, 邵永胜, 张应天, 吴文良, 刘文, 江汉大学附属医院胃肠外科 江汉大学普通外科研究所 湖北省武汉市 430015
作者贡献分布: 此课题由彭开勤、邵永胜及张应天设计; 研究过程由彭开勤、邵永胜、吴文良及刘文操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由吴文良提供; 数据分析由邵永胜与吴文良完成; 本论文写作由彭开勤、邵永胜及张应天完成.
通讯作者: 邵永胜, 430015, 湖北省武汉市, 江汉大学附属医院胃肠外科 江汉大学普通外科研究所.
shaoyongsheng1211@medmail.com.cn
电话: 027-92440571
收稿日期: 2008-03-25 修回日期: 2008-07-24
接受日期: 2008-08-12 在线出版日期: 2008-10-08

A proposed lymph node staging system for colorectal cancer

Kai-Qin Peng, Yong-Sheng Shao, Ying-Tian Zhang, Wen-Liang Wu, Wen Liu

Kai-Qin Peng, Yong-Sheng Shao, Ying-Tian Zhang, Wen-Liang Wu, Wen Liu, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Jianghan University; Institute of General Surgery of Jianghan University, Wuhan 430015, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Yong-Sheng Shao, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Jianghan University, Wuhan 430015, Hubei Province, China. shaoyongsheng1211@medmail.com.cn
Received: 2008-03-25 Revised: 2008-07-24
Accepted: 2008-08-12 Pubilshed online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To analyze the correlation between lymph node metastasis and prognosis in colorectal cancer patients and thus propose a new lymph node staging system for colorectal cancer.

METHODS: The five-year survival rate was compared in 122 colorectal cancer patients according to their different TNM staging state (AJCC/UICC). N_3 stage was defined as more than 10 lymph node metastasis and/or sentinel node positive, then the five-year survival rates were compared in N_0, N_1, N_2 and N_3 stage patients; subsequently, survival rates were calculated using Kaplan-Meier method and survival curves were generated. Log-rank was performed to verify the survival rate.

RESULTS: The five-year survival rate declined as TNM stage increased (Ⅰ stage 100%, Ⅱ stage 81.82%, ⅢAB stage 69.39%, ⅢC stage 15%, Ⅳ stage 0, $P < 0.01$). Simultaneously, it was also observed that higher N stage was associated with lower five-year survival rate (N_0 Ⅰ stage100%, N_0 Ⅱ stage 89.82%, N_1 stage 69.39%, N_2 stage 15%, $P < 0.01$). The five-year survival rate was 0% for N_3 stage patients and the similar result was also observed in TNM Ⅳ stage patients.

CONCLUSION: We recommend that the N staging of TNM system for colorectal cancer can be defined as following: N_0: no lymph node metastasis; N_1: 1-3 lymph node metastasis; N_2: 4-9 lymph node metastasis; N_3: ≥10 lymph node metastasis. N_3 stage can be considered as subclinical metastasis since the five-year survival rate for the patients in this stage is 0%, similar to M_1 stage patients.

Key Words: Colorectal cancer; Lymph node metastases; Staging

Peng KQ, Shao YS, Zhang YT, Wu WL, Liu W. A proposed lymph node staging system for colorectal cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3238-3241

摘要

目的: 分析结直肠癌淋巴结转移状况与预后的关系, 提出新的结直肠癌淋巴结分期方案.

方法: 122例病理资料完整的结直肠癌病例, 比较不同TNM分期(AJCC/UICC)病例的5年生存率; 将淋巴结转移数目≥10枚和顶端淋巴结转移拟定为N_3期, 比较AJCC/UICC的TNM分期中N_0、N_1、N_2与N_3期病例的5年生存率; 按Kaplan-Meier方法计算生存率, 绘制生存曲线, 并对生存率进行Log-rank检验.

结果: 随着TNM分期的上升, 5年生存率逐渐下降(Ⅰ期为100%; Ⅱ期为81.82%; ⅢAB期为69.39%, ⅢC期为15%; Ⅳ期为0, $P<0.01$), 随着N分期的上升, 5年生存率也逐渐下降(N_0 Ⅰ期为100%、N_0 Ⅱ期为89.82%、N_1期69.39%, N_2期为15%, $P<0.01$). N3期病例5年生存率为0, 与TNM的Ⅳ期预后相似.

结论: 建议将结直肠癌TNM中的N分期定为:

■同行评议者
黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科; 孙延平, 副主任医师, 中国人民解放军上海第二军医大学附属长征医院普外科

无淋巴结转移为N_0, 1-3枚淋巴结转移为N_1, 4-9枚淋巴结转移为N_2, ≥10枚淋巴结转移和/或顶端淋巴结转移为N_3. N_3期患者的5年生存率为0, 与M_1期结果相似, 可以定为亚临床转移.

关键词: 结直肠癌; 淋巴结转移; 分期

彭开勤, 邵永胜, 张应天, 吴文良, 刘文. 结直肠癌淋巴结的分期. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3238-3241
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3238.asp

■**研发前沿**
AJCC/UICC的TNM分期系统方案已公布10余年, 国内至今未见用此分期的文献报道, 说明国内尚未认识定量淋巴结检查和分期的重要意义.

0 引言

结直肠癌淋巴结转移的重要性早在1932年的Dukes分期中就已明确. 美国癌症联合会(AJCC)和国际抗癌联合会(UICC)的TNM分期系统中, 凡有淋巴结转移者皆为Ⅲ期, 1-3枚肠壁旁淋巴结转移为N_1期, ≥4枚淋巴结转移为N_2期, 确定了淋巴结转移数目作为分期标准的合理性[1]. 在日本结直肠癌和肛管癌的临床和病理研究常规(JGR)中, 根据转移淋巴结的部位是位于供血动脉的根部、或沿供血动脉分布及其距肿瘤的距离进行分期.

虽有对比研究结果表明, 日本JGR分期优于AJCC/UICC的TNM分期[2-3], 淋巴结转移部位比淋巴结转移数目有更大的预测价值[4], 但多数文献仍采用AJCC/UICC的TNM分期方案[2-6]. 主要原因是JGR分期过于繁琐, 而且未规定是在新鲜标本抑或福尔马林固定标本上测量, 难以确定淋巴结与肿瘤间的准确距离. AJCC/UICC的TNM分期对评估结直肠癌的预后和指导综合治疗的价值虽得共识, 但对结直肠癌手术标本中局部淋巴结最少应检查多少枚, 每枚淋巴结作几张切片检查, 并无明文规定. 而且, 其N分期单以淋巴结转移≥4枚定为N_2也较笼统而不够精确.

我科从1989年起, 开始作结直肠癌淋巴结转移与分期预后的研究, 制定了结直肠癌病理检查规范, 提出淋巴结分期中应该有N_3期. 现将具体研究结果报告如下.

1 材料和方法

1.1 *材料* 收集1989-01/2003-12病理资料完整的结直肠癌病例共122例. 其中, 结肠癌80例, 直肠癌42例. 男63例, 女59例. 年龄中位数61.59(21-87)岁.

1.2 *方法*

1.2.1 *淋巴结病理检查规范*: (1)切除标本采用淋巴结显示技术, 即用丙酮脱脂和美蓝染色后透光法全数取出淋巴结; (2)每枚淋巴结分3平面作6张切片HE染色和1张切片细胞角蛋白免疫组化染色; (3)专项检查主干血管根部淋巴结, 命名为顶端淋巴结.

1.2.2 *分期方案*: 采用AJCC/UICC的TNM分期方案: T_1指癌侵及黏膜下, T_2指侵及肌层, T_3指侵犯浆膜或侵入无浆膜的结直肠周围组织, T_4指穿透浆膜或/和侵犯其他器官或结构; N_0为无淋巴结转移, N_1为1-3枚淋巴结转移, N_2为≥4枚淋巴结转移; 无远处转移为M_0, 有远处转移为M_1. Ⅰ期为$T_{1-2}N_0M_0$, Ⅱ期为$T_{3-4}N_0M_0$, Ⅲ期为$N_{1-2}M_0$, Ⅳ期为M_1. 另外, 结合本组资料结果, 将淋巴结转移数目≥10枚和顶端淋巴结转移定为N_3.

本组病例随访率达98.4%, 随访时间为48-194 mo.

统计学处理 按Kaplan-Meier方法计算生存率, 绘制生存曲线, 并对生存率进行Log-rank检验. 统计学处理用SPSS11.5统计软件完成.

2 结果

2.1 *淋巴结检查数目和转移状况* 本组122例结直肠癌手术标本共检查淋巴结6236枚, 平均51.11±18.15枚(15-128枚). 结肠癌80例, 共查淋巴结4192枚, 平均每例52.40±20.10枚; 直肠癌42例, 共查淋巴结2044枚, 平均每例48.67±20.13枚.
122例中, 69病例有淋巴结转移, 淋巴结转移率为56.65%; 淋巴结转移1-3枚49例, 转移≥4枚20例(4-9枚12例, ≥10枚8例). 6236枚淋巴结共有361枚转移, 淋巴结转移度为5.79%.

2.2 *顶端淋巴结* 122例检查顶端淋巴结共514枚, 平均4.21±2.36枚(1-17枚). 其中12例有淋巴结转移, 淋巴结转移率为9.84%. 淋巴结转移数17枚, 平均1.42±1.02枚.

2.3 *预后分析* 122例总体5年生存率为89.34%, 其中Ⅰ期病例为100%; Ⅱ期病例为81.82%; ⅢAB期(N_1)为69.39%, ⅢC期(N_2)为15%; Ⅳ期5年生存率为0(图1, $P<0.01$).

本组有8例淋巴结转移≥10枚, 均在23 mo内死亡(表1); 顶端淋巴结转移12例, 均在43 mo内死亡(表2). 我们将淋巴结转移≥10枚和顶端淋巴结转移病例的淋巴结分期定为N_3, 共17例, 5年生存率为0. (图2, $P<0.01$).

3 讨论

结直肠癌分期不仅可以估计患者的预后、指导辅助治疗方案的选择, 还有助于不同研究资料的比较. 结直肠癌分期方案的变化, 主要是淋

■应用要点
结直肠癌分期不仅可以估计患者的预后、指导辅助治疗方案的选择，还有助于不同研究资料的比较.

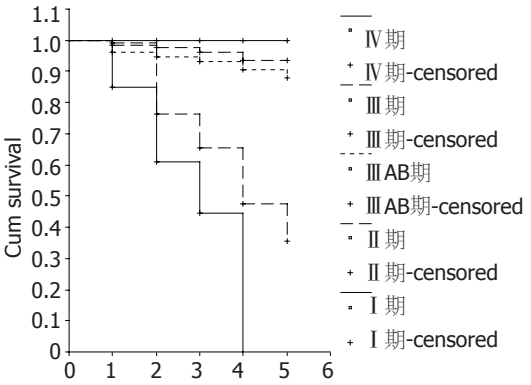


图 1 不同TNM分期病例5年生存率的比较.

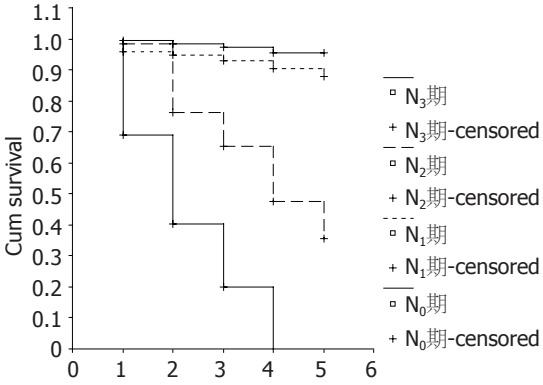


图 2 不同N分期病例5年生存率的比较.

表 1 淋巴结转移≥10枚病例的结局

编号	诊断	年龄(岁)	LNM数/总数	生存时间(mo)
1	结肠癌	61	10/46	21
2	结肠癌	65	10/44	5
3	结肠癌	78	13/82	9
4	直肠癌	43	16/28	23
5	直肠癌	66	17/60	3
6	直肠癌	47	23/68	12
7	结肠癌	42	31/45	6
8	结肠癌	43	17/44	20

表 2 顶端淋巴结转移病例的结局

编号	诊断	年龄(岁)	LNM数/总数	顶端LNM数/总数	生存时间(mo)
1	结肠癌	68	4/50	2/12	43
2	直肠癌	66	17/60	2/17	3
3	结肠癌	59	1/52	1/8	29
4	结肠癌	38	1/25	1/6	12
5	结肠癌	73	9/12	1/9	12
6	结肠癌	42	31/45	2/3	6
7	直肠癌	51	9/43	3/13	31
8	直肠癌	53	1/43	1/9	13
9	结肠癌	49	6/42	2/8	8
10	结肠癌	40	1/32	1/2	15
11	结肠癌	77	3/38	1/3	13
12	结肠癌	43	17/44	1/2	20

巴结分期的改变. 同乳癌和胃癌的分期一样，结直肠癌淋巴结分期由定性向定量转变. AJCC/UICC的TNM分期系统方案已公布10余年，国内至今未见用此分期的文献报道，说明国内尚未认识定量淋巴结检查和分期的重要意义.

单张切片只能观察到一个淋巴结约1%的组织[7]. 因此，每枚淋巴结只做一张切片H.E染色检查，必然导致淋巴结转移的漏检和分期下移. 我们在乳癌和胃癌局部淋巴结的检查中发现，6张切片HE染色阳性率与1张切片细胞角蛋白免疫组化染色检出率相近，1张切片细胞角蛋白免疫组化染色能检出淋巴结微转移，而H.E染色则不易发现[8-9].

准确判断结直肠癌的预后，以及选择最佳的治疗方案，皆依赖于从切除标本中准确获取和检查淋巴结；正式或非正式的医学继续教育可帮助外科医师和病理学医师提高淋巴结的检测水平，增加淋巴结检查数目[10]. Wong *et al*报告，结直肠癌患者的手术标本中，检查淋巴结≥14枚方可准确分期[11]. 我们采用淋巴结显示技术全数获取结直肠癌手术标本中的淋巴结，平均取得51枚/例(15-128枚)淋巴结；每枚淋巴结分3平面做6张切片HE染色和1张切片细胞角蛋白免疫组化染色检查，因而获得的淋巴结转移状况更接近真实，能得出准确的N分期，对预后的判断和辅助化疗的选择更具有客观的科学证据.

按照AJCC/UICC的TNM分期方案，本组资料中不同分期病例的5年生存率随分期上升而下降；尤其是ⅢAB期(N_1)和ⅢC期(N_2)病例的5年生存率分别为69.39%和15%(图1，$P<0.01$). 由此可见，淋巴结定量分期比定性分期能更准确地判断预后.

AJCC/UICC的结直肠癌TNM分期也有不足. 1997年修订的UICC第5版胃癌TNM分期规定，无淋巴结转移为N_0，1-6枚淋巴结转移为N_1，7-15枚淋巴结转移为N_2，≥16枚淋巴结转移为N_3[8]. 而AJCC/UICC的结直肠癌TNM分期中，N分期只有N_1和N_2而无N_3，将淋巴结转移数目≥4枚笼统归为N_2，因而不能更为准确地分期和判断预后.

本组资料显示，淋巴结转移≥10枚的8例患者均在23 mo内死亡，顶端淋巴结转移的12例(其

中3例淋巴结转移≥10枚)患者均在43 mo内死亡. 我们拟将此17例患者的淋巴结分期定为N_3, 其5年生存率为0, 与N_2期患者的5年生存率有明显差异(P<0.01).

因此, 我们强调淋巴结显示技术和连续切片检查的重要性, 在此基础上建议将结直肠癌TNM中的N分期定为: 无淋巴结转移为N_0, 1-3枚淋巴结转移为N_1, 4-9枚淋巴结转移为N_2, ≥10枚淋巴结转移和/或顶端淋巴结转移为N_3. N_3期患者的5年生存率为0, 与M_1期结果相似, 可以定为亚临床转移.

4 参考文献

1 O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1420-1425

2 Hida J, Yasutomi M, Fujimoto K, Maruyama T, Kubo R, Okuno K, Shindo K. Comparison between the Japanese general rules and the TNM system in the regional lymph node classification of carcinoma of the colon. *J Am Coll Surg* 1996; 183: 611-615

3 Hida J, Okuno K, Yasutomi M, Yoshifuji T, Matsuzaki T, Uchida T, Ishimaru E, Tokoro T, Shiozaki H. Number versus distribution in classifying regional lymph node metastases from colon cancer. *J Am Coll Surg* 2005; 201: 217-222

4 Shida H, Ban K, Matsumoto M, Masuda K, Imanari T, Machida T, Yamamoto T. Prognostic significance of location of lymph node metastases in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 1046-1050

5 Tang R, Wang JY, Chen JS, Chang-Chien CR, Tang S, Lin SE, You YT, Hsu KC, Ho YS, Fan HA. Survival impact of lymph node metastasis in TNM stage III carcinoma of the colon and rectum. *J Am Coll Surg* 1995; 180: 705-712

6 Hida J, Mori N, Kubo R, Matsuda T, Morikawa E, Kitaoka M, Sindoh K, Yasutomi M. Metastases from carcinoma of the colon and rectum detected in small lymph nodes by the clearing method. *J Am Coll Surg* 1994; 178: 223-228

7 Berger AC, Sigurdson ER, LeVoyer T, Hanlon A, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, Haller DG. Colon cancer survival is associated with decreasing ratio of metastatic to examined lymph nodes. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8706-8712

8 邵永胜, 彭开勤, 张彤, 刘丽江, 龚少敏, 张应天. 细胞角蛋白免疫组化染色在乳癌腋淋巴结转移检测中的价值. 中国实用外科杂志 1997; 17: 98-99

9 彭开勤, 刘丽江, 张应天, 刘文, 龚少敏, 全卓勇, 邵永胜. 一种新的胃癌淋巴结分期方案. 中华外科杂志 2001; 39: 908-910

10 Smith AJ, Law CH, Khalifa MA, Hsieh ET, Hanna SS, Wright FC, Poldre PA. Multimodal CME for surgeons and pathologists improves colon cancer staging. *J Cancer Educ* 2003; 18: 81-86

11 Wong JH, Johnson DS, Hemmings D, Hsu A, Imai T, Tominaga GT. Assessing the quality of colorectal cancer staging: documenting the process in improving the staging of node-negative colorectal cancer. *Arch Surg* 2005; 140: 881-886; discussion 886-887

■**同行评价**
本文内容较好, 文笔流畅, 有实用性, 可读性较好, 对临床工作有较高的参考价值.

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

世界华人消化杂志网络版的发表前链接

本刊讯 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程. (常务副总编辑: 张海宁 2008-10-08)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3242-3245
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

器官功能不全患者行胶囊内镜检查的肠道准备

徐 龙, 吕农华, 朱 萱, 徐 萍, 陈幼祥, 祝 荫, 何怀纯, 华开罗

■背景资料
器官功能衰竭患者大多耐受性差, 不能进行传统内镜检查, 胶囊内镜检查患者耐受性较好, 但是由于心肺肾功能不全的患者不能服用大量液体, 使得其肠道准备不充分, 使得胶囊内镜在这些患者应用受到限制.

徐龙, 吕农华, 朱萱, 徐萍, 陈幼祥, 祝荫, 何怀纯, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006
华开罗, 湖北省中山医院消化内科 湖北省武汉市 430033
作者贡献分布: 此课题由徐龙、吕农华、朱萱、徐萍及陈幼祥设计; 研究过程由徐龙、吕农华、朱萱、徐萍、陈幼祥及何怀纯操作完成; 数据分析由徐龙、祝荫及华开罗完成; 本论文写作由徐龙完成.
通讯作者: 徐龙, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省消化疾病诊疗中心.
dlxulong@yahoo.com.cn
电话: 0791-8692505
收稿日期: 2008-06-30 修回日期: 2008-08-19
接受日期: 2008-08-26 在线出版日期: 2008-10-08

Bowel preparation for capsule endoscopy in organ dysfunction patients

Long Xu, Nong-Hua Lv, Xuan Zhu, Ping Xu, You-Xiang Chen, Yin Zhu, Huai-Chun He, Kai-Luo Hua

Long Xu, Nong-Hua Lv, Xuan Zhu, Ping Xu, You-Xiang Chen, Yin Zhu, Huai-Chun He, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Kai-Luo Hua, Department of Gastroenterology, Yexian-Sun Hospital of Hubei Province, Wuhan 430033, Hubei Province, China
Correspondence to: Long Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 17 Yongwaizheng Street, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. dlxulong@yahoo.com.cn
Received: 2008-06-30 Revised: 2008-08-19
Accepted: 2008-08-26 Published online: 2008-10-08

Abstract

AIM: To determine the bowel preparation for capsule endoscopy (CE) in patients with organ dysfunction.

METHODS: Forty three patients suspected of bowel diseases in our hospital were included in this prospective study. Control group (Group A, without organ dysfunction or failure) were treated with sodium phosphate and enough water. Twenty three organ dysfunction patients were randomly assigned to group B (liquid diet for 3 d, less sodium phosphate and less water) and to group C (fasting 3 d and parenteral alimentation). Indicators including the comfort, enteric visibility and extensity of patients were observed.

RESULTS: Group B and group C, which showed no significant difference between themselves, had better comfort than group A during the examination. There was not significant difference in cleanness and visibility on CE in whole small bowel between group A and group B. Group C showed decreased visibility in lower-half small bowel, but no difference in upper-half small bowel, compared with group A and B (12.6 ± 3.6 *vs* 52.4 ± 13.3, 46.6 ± 8.1; 21.2 ± 9.3 *vs* 46.4 ± 11.2, 49.7 ± 9.3, all $P < 0.01$). Extensity of group C was less than group A and group B (24.4 ± 4.8 *vs* 45.2 ± 8.2, 46.5 ± 9.4, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: Capsule endoscopy can be performed on organ dysfunction patients. According to location of diseases, appropriate bowel preparation is needed, for example, some laxative and less water for whole small bowel, and 3 d fasting for upper-half small bowel.

Key Words: Capsule endoscope; Organ dysfunction; Bowel preparation

Xu L, Lv NH, Zhu X, Xu P, Chen YX, Zhu Y, He HC, Hua KL. Bowel preparation for capsule endoscopy in organ dysfunction patients. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3242-3245

摘要

目的: 探讨心、肺、肾等脏器功能不全的特殊患者行胶囊内镜检查时肠道准备的方法.

方法: 2007-09/2008-06我院收治的疑为小肠疾病的患者43例, 分为A组: 不伴有器官功能衰竭患者(磷酸盐口服液和大量清水), 伴有器官功能不全患者随机分为B组(3 d流质饮食, 磷酸盐口服液和少量清水)和C组(3 d禁食). 观察患者的舒适性、肠道的清晰度以及肠腔充盈度等指标.

结果: 行特殊肠道准备的B组和C组, 患者不适的发生率较A组明显减少, 而B组和C组之间无差异. A、B两组患者小肠检查全程清洁度无差异. C组小肠清洁和较清洁的上半肠段与A、B两组上半小肠段比较无差异, 而C组下

■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

半段小肠的肠腔清晰度与A、B两组比较有明显下降(12.6±3.6 *vs* 52.4±13.3, 46.6±8.1; 21.2±9.3 *vs* 46.4±11.2, 49.7±9.3, 均P<0.01); A、B两组患者肠腔充盈度比较无差异, 而C组与A、B组比较, 充盈度明显下降(24.4±4.8 *vs* 45.2±8.2, 46.5±9.4, 均P<0.01).

结论: 心肺肾等器官功能不全的患者可以进行胶囊内镜检查, 检查时可以根据患者不同的检查目的选择合适的肠道准备方法.

关键词: 胶囊内镜; 器官功能不全; 肠道准备

徐龙, 吕农华, 朱萱, 徐萍, 陈幼祥, 祝荫, 何怀纯, 华开罗. 器官功能不全患者行胶囊内镜检查的肠道准备. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3242–3245
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3242.asp

0 引言

胶囊内镜检查的患者依从性比普通电子内镜要好, 许多不适应进行电子内镜检查的患者可以采用胶囊内镜检查[1]. 但是器官功能衰竭患者进行胶囊内镜检查时, 同样也不能耐受服用较多液体的肠道准备. 本研究采用前瞻性的研究方法, 探索适合这些患者进行胶囊内镜检查的肠道准备方法[2].

1 材料和方法

1.1 *材料* 2007-09/2008-06期间, 我院收治的疑为小肠疾病的患者43例行胶囊内镜检查(OMOM胶囊式内窥镜), 所用智能胶囊(金山科技, 重庆)由护理人员随机从库存中取出. 以统一的表格告知每个患者检查过程和注意事项.

1.2 *方法*

1.2.1 *分组及肠道准备*: 一般人群胶囊内镜检查采用的肠道准备方法设为A组(n = 20). 有严重通气障碍、心衰、肾器官功能不全不适宜服用大量液体的患者(包括部分拒绝服用大量液体进行肠道准备者), 采用特殊的肠道准备, 随机分配到B组(n = 12)和C组(n = 11). A组: 检查前3 d流质, 检查前晚8点后禁食, 检查前夜和当日6点分别服用磷酸盐口服液40+750 mL温开水. 检查前30 min-2 h加服1.9/L二甲基硅油(二甲基硅油散19 g+100 mL清水). B组: 检查前3 d进食流质, 检查前晚8点后禁食, 检查前夜和当日分别口服磷酸盐口服液30+200 mL清水, 检查前30 min-2 h加服1.9/L二甲基硅油散19 g+100 mL清水. C组: 检查前禁食3 d, 予以肠道外营养治疗. 检查前30 min-2 h加服(或者不口服)1.9/L二甲基硅油散19 g+100 mL清水.

1.2.2 *肠道准备效果的评价*: 本研究使用OMOM图像分析中的面积计算方法, 选择闭合曲线和面积计算方法, 定量计算肠腔内气泡、粪质和粪渣占所见肠腔的百分比, 可进行精确百分比计算. 两位有丰富传统电子纤维内镜诊断经验的研究者独立地评价胶囊内镜所拍摄的图像. 评价者先不知道患者采用的何种肠道准备方法, 评价指标: (1)清晰度. 判断分为清洁(95%以上肠黏膜清晰可见不影响诊断), 较清洁(50%-95%黏膜可见, 有少量粪渣或气泡), 不清洁(0%-50%黏膜可见, 有大量粪渣或粪块, 影响观察). (2)肠腔充盈度. 观察清洁和较清洁肠段中的肠腔充盈情况, 分为充盈(肠腔呈类圆形, 可以看见前方2个以上环形皱襞), 较充盈(肠腔呈卵圆形, 可以看见前方1-2个环形皱襞), 不充盈(肠腔紧闭, 不能看见前方环形皱襞). 假定胶囊在肠腔中作匀速运动, 比较每种清晰度和充盈度分类所占时间与该次检查的智能胶囊小肠停留总时间的百分比.

统计学处理 组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), P<0.05认为有统计学意义. 2位独立的医师读片结果的一致性采用Pearson相关分析, P<0.05认为相关性具有统计学意义.

2 结果

2.1 *临床资料* 三组患者均为汉族人, 三组之间性别无明显差异, B组和C组患者年龄比A组大, 差异有统计学意义. A组患者无心肾功能和通气功能障碍, B组和C组心肾功能和通气功能障碍患者的比例无差异, B组另有两例拒绝服用大量液体做肠道准备的患者. 三组患者均以不明原因消化道出血为最主要的适应证, 还有腹痛和不明原因缺铁性贫血等. A组胶囊内镜检查有9例, B组和C组各3例未见明显异常, 均以血管畸形和间质瘤为最多见的病变(表1).

胶囊开始工作后平均13 s进入胃腔, 进入小肠的时间平均为83 min, 最快4 min, 最慢275 min. 在小肠内停留的时间平均为232 min, 最短158 min, 最长342 min, 进入结肠的平均平均为344 min. A组有3例胶囊在回肠中停止工作, B组C组各1例. 胶囊在食管、胃和小肠停留时间无统计学差异(表2).

2.2 *患者舒适性的调查* 本组患者有23例检查过电子纤维胃镜或肠镜, 此23例一致对胶囊内镜

■**研发前沿**
目前胶囊内镜的临床研究取得了较多进展, 使用缓泻剂和促动力药可以改善胶囊内镜检查的图片质量.

■应用要点
本研究中的两种肠道准备方法患者舒适性明显提高, 不影响患者的器官功能. 小肠黏膜清晰度和充盈度与普通方法比较无差异.

的舒适性表示满意. 行特殊肠道准备的B组和C组患者, 心肺肾功能无加重, 腹胀, 腹痛, 呕吐和肛周不适等发生率较A组患者明显减少, B组和C组患者两组之间无差异(表3).

2.3 小肠清晰度的观察 AB两组患者小肠检查全程清晰度无差异. 而C组小肠上半小肠清洁和较清洁的肠段与AB两组比较无差异, 而不清洁肠段占9.2%±2.4%, 与AB两组比较有差异. 而C组小肠下半段的肠腔清晰度明显变差, 清洁、较清洁和不清洁的肠段所占比例与AB两组比较均有显著差异(表4). 2位有丰富电子内镜诊断经验的医师独立读片, 结果具有一致性, Pearson-r为0.89, P<0.05.

2.4 小肠充盈度的观察 AB两组患者肠腔充盈度比较无差异. C组与A组B组比较, 充盈度明显下降, 充盈、不充盈所占肠段百分比与另两组之间均有差异, 较充盈肠段所占百分比和A组与比较有差异, 与B组比较无差异(表5). 两位医师独立读片结果具有一致性, Pearson-r为0.72, P<0.05.

表 1 临床资料分析

临床特点	A组	B组	C组
年龄	47.4±21.54	63.6±3.8[a]	65.6±6.4[b]
男/女	12/8	5/7	6/5
并发症			
心功能不全	0	3	2
肾功能不全	0	4	4
严重通气障碍	0	3	5
拒绝口服大量液体	0	2	0
检查原因			
不明出血	14	6	5
腹痛	1	2	3
不明缺铁性贫血	3	3	3
其他	2	1	0
胶囊内镜所见			
未见明显异常	9	3	3
血管畸形	5	2	2
间质瘤	4	4	2
其他	2	3	2

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* A组.

3 讨论

胶囊内镜检查前的肠道准备目前尚无统一标准[3]. Viazis *et al*认为检查前禁食8-12 h即可[1,4], 但我们在传统电子内镜和胶囊内镜的检查中发现, 在中国的患者仅仅禁食8-12 h, 小肠下段尤其是结肠仍然有很多粪质, 获得的黏膜图象质量很差, 不能满足诊断需要. 而Franke *et al*研究提示肠道准备使用轻泻剂能提高胶囊内镜检查患者的图片质量[5]. 最近Niv *et al*进行的Meta分析显示, 各种肠道准备可以显著提高肠道黏膜的影像清晰度, 而对传输时间无明显影响[6].

临床上怀疑小肠或者结肠疾病的患者, 如同时有心、肺、肾功能不全则不能耐受传统电子纤维内镜检查, 勉强进行检查, 患者十分痛苦, 并有可能诱发严重的不适或并发症, 是否可以进行胶囊内镜检查? 但是以往研究仅仅禁食导致肠道的清晰度不足, 影响病灶的观察, 而传统肠道准备需要较短时间内口服大量清水, 心肺肾功能不全的患者不能耐受, 需要对这类患者胶囊内镜检查的探索能耐受的肠道准备方法[7]. 目前尚没有对这些特殊患者进行胶囊内镜检查的报道[8].

本研究针对这些特殊患者设计了两种肠道准备方法(B组和C组). 心、肺、肾功能不全患者的年龄偏大, 不耐受一般肠道准备, 所以本研究中B组和C组年龄比A组偏大. 众所周知, 心、肺、肾功能不全患者不能饮用大量液体, 可诱发或加重器官功能不全, 本研究设计的两种肠道准备方法, 饮水量少, 这些特殊患者在检查中均没有明显不适.

由经验发现, 不进行肠道准备, 有较多的肠管清晰度极差, 另外由于胶囊内镜检查时大部分时间不能适时观察, 也不能象普通纤维内镜检查那样进行抽水与充气等处理, 使得肠道中的粪质或残渣可较多的影响, 因此, 本研究中所有检查者均采用了甘露醇作为泻剂, 并且甘露醇可以经过发酵产生氢气等气体[9], 有利于肠腔充盈, 可使观察盲区进一步减少, 本研究采用甘露醇作肠道准备, 取得满意效果. 使用了甘露醇的A组和B组的肠腔充盈度比没有使用甘露醇的C组更加满意, 有助于肠腔黏膜的细致观察[10]. 虽然甘露醇发酵产生的气体可以引起燃烧爆炸等危险, 但是由于胶囊完全密封绝缘, 不能进行电切除等操作, 不会产生与气体相关的不良事件[11].

本研究的B组患者, 全小肠均取得非常满意的小肠清晰度. 适合于特殊患者全小肠检查的肠道准备. C组患者患者禁食仅予以肠道外营养做支持治疗, 对患者体液代谢无影响. 患者的肠腔的清晰度在小肠上段满意不影响检查, 而小肠下段清晰度逐渐变差, 临近回肠末端时粪质严重影响检查[12]. 所以, 从本研究推断, 我国患者

■同行评价
本文选题较好, 有一定的科学性及创新性, 对临床也有较大的指导意义.

表 2 胶囊在小肠有效工作时间比较

分组	*n*	食管(s)	胃(min)	小肠(min)	总时间(min)	未到达结肠
A	20	6 ± 1.5	37.36 ± 25.46	253.36 ± 104.23	457.52 ± 134.45	3
B	12	7 ± 2	43.25 ± 36.42	272.28 ± 125.46	435.47 ± 115.35	1
C	11	6 ± 2.5	39.37 ± 28.35	253.42 ± 115.43	472.39 ± 128.31	1

表 3 胶囊内镜检查时患者舒适性的调查 (%)

分组	*n*	腹胀	腹痛	呕吐	肛周不适
A	20	20(100)	19(95)	4(20)	7(35)
B	12	4(33.3)[b]	2(17)[b]	2(17)	2(17)
C	11	0(0)[b]	2(18)[b]	0(0)	0(0)[a]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* A组.

表 4 胶囊内镜检查时小肠清晰度的观察 (%)

	A组	B组	C组	
			(上1/2小肠)	(下1/2小肠)
清洁	52.4 ± 13.3	46.6 ± 8.1	44.8 ± 8.4	12.6 ± 3.6[bd]
较清洁	46.4 ± 11.2	49.7 ± 9.3	46.0 ± 9.2	21.2 ± 9.3[bd]
不清洁	1.4 ± 0.5	3.7 ± 1.2	9.2 ± 2.4[bd]	62.2 ± 8.2[bd]

[b]$P<0.01$ *vs* A组; [d]$P<0.01$ *vs* B组.

表 5 胶囊内镜检查时小肠充盈度的比较 (%)

	A组	B组	C组
充盈	45.2 ± 8.2	46.5 ± 9.4	24.4 ± 4.8[bd]
较充盈	41.1 ± 5.2	38.1 ± 4.8	35.2 ± 6.5[a]
不充盈	13.4 ± 4.1	15.4 ± 5.6	36.4 ± 7.4[bd]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* A组; [d]$P<0.01$ *vs* B组.

进行胶囊内镜检查的肠道准备, 仅仅短时间的禁食是不够的. 但是也可得出, C组的肠道准备方法也适合需要采用胶囊内镜检测上消化道和上半小肠的心、肺、肾功能不全患者[13].

本研究采用的面积定量计算的方法进行肠腔图片质量分析, 比其他研究的八分法更加准确[7], 值得在今后类似的研究中推广应用.

结论, 心肺肾功能不全的患者可以进行胶囊内镜检查, 检查时可以根据患者不同的检查目的选择个性化的肠道准备方法. B组的肠道准备方法, 适用于不能口服大量液体的, 目的是观察全消化道的患者的胶囊内镜检查. 3 d禁食使用肠外营养支持的肠道准备方法适用于目的是观察上消化道和上半小肠的器官功能不全的患者.

4 参考文献

1 Viazis N, Sgouros S, Papaxoinis K, Vlachogiannakos J, Bergele C, Sklavos P, Panani A, Avgerinos A. Bowel preparation increases the diagnostic yield of capsule endoscopy: a prospective, randomized, controlled study. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 534-538

2 戈之铮, 胡运彪, 萧树东. 胶囊内镜与推进式小肠镜诊断不明原因消化道出血的评价. 中华消化内镜杂志 2003; 20: 223-226

3 Niv Y, Niv G. Capsule endoscopy: role of bowel preparation in successful visualization. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1005-1009

4 Niv Y, Niv G, Wiser K, Demarco DC. Capsule endoscopy - comparison of two strategies of bowel preparation. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 957-962

5 Franke A, Hummel F, Knebel P, Antoni C, Bocker U, Singer MV, Lohr M. Prospective evaluation of small bowel preparation with bisacodyl and sodium phosphate for capsule endoscopy. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2061-2064

6 Fireman Z, Kopelman Y, Fish L, Sternberg A, Scapa E, Mahaina E. Effect of oral purgatives on gastric and small bowel transit time in capsule endoscopy. *Isr Med Assoc J* 2004; 6: 521-523

7 Niv Y. Efficiency of bowel preparation for capsule endoscopy examination: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 1313-1317

8 Shiotani A, Opekun AR, Graham DY. Visualization of the small intestine using capsule endoscopy in healthy subjects. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1019-1025

9 Wei W, Ge ZZ, Lu H, Gao YJ, Hu YB, Xiao SD. Purgative bowel cleansing combined with simethicone improves capsule endoscopy imaging. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 77-82

10 Kalantzis C, Triantafyllou K, Papadopoulos AA, Alexandrakis G, Rokkas T, Kalantzis N, Ladas SD. Effect of three bowel preparations on video-capsule endoscopy gastric and small-bowel transit time and completeness of the examination. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 1120-1126

11 Ge ZZ, Chen HY, Gao YJ, Hu YB, Xiao SD. The role of simeticone in small-bowel preparation for capsule endoscopy. *Endoscopy* 2006; 38: 836-840

12 Hookey LC, Depew WT, Vanner SJ. Combined low volume polyethylene glycol solution plus stimulant laxatives versus standard volume polyethylene glycol solution: a prospective, randomized study of colon cleansing before colonoscopy. *Can J Gastroenterol* 2006; 20: 101-105

13 Villa F, Signorelli C, Rondonotti E, de Franchis R. Preparations and prokinetics. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2006; 16: 211-220

编辑 李军亮 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2008年10月8日; 16(28): 3246-3247
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

病例报告 CASE REPORT

溃疡性结肠炎合并甲状腺功能亢进症1例

陈文科, 邹 兵, 叶红军, 张智翔

■背景资料
溃疡性结肠炎(UC)与甲状腺功能亢进症发病均与自身免疫反应有关, 但两者合并存在罕见.

陈文科, 邹兵, 叶红军, 张智翔, 北京大学深圳医院消化内科 广东省深圳市 518036
作者贡献分布: 本文写作由陈文科完成; 邹兵、叶红军及张智翔审校.
通讯作者: 陈文科, 518036, 广东省深圳市福田区莲花路1120号, 北京大学深圳医院消化内科. chenwenkegd@126.com
电话: 0755-83923333-3703 传真: 0755-83089011
收稿日期: 2008-07-15 修回日期: 2008-08-26
接受日期: 2008-09-01 在线出版日期: 2008-10-08

One-case analysis of ulcerative colitis co-existing with hyperthyroidism

Wen-Ke Chen, Bing Zou, Hong-Jun Ye, Zhi-Xiang Zhang

Wen-Ke Chen, Bing Zou, Hong-Jun Ye, Zhi-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China
Correspondence to: Wen-Ke Chen, Department of Gastroenterology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China. chenwenkegd@126.com
Received: 2008-07-15 Revised: 2008-08-26
Accepted: 2008-09-01 Published online: 2008-10-08

Abstract
A famale patient of 59 years old was admitted to hospital because of venting faeces with grume and blood for 10 years, and aggravating for 1 wk. She was diagnosed with ulcerative colitis. A diagnosis of hyperthyroidism was made 15 yeas ago. Both diseases recurrently outbroke and were in the active stage. The patient was discharged from hospital after treatment and both diseases were improved well.

Key Words: Ulcerative colitis; Hyperthyroidism

Chen WK, Zou B, Ye HJ, Zhang ZX. One-case analysis of ulcerative colitis co-existing with hyperthyroidism. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(28): 3246-3247

摘要
患者, 女性, 59岁, 因“反复排黏液血便10年, 加重1 wk入院, 诊断为溃疡性结肠炎. 有“甲状腺功能亢进症”病史15年. 两种疾病反复发作, 入院后检查均呈活动表现, 同时治疗后病情好转出院, 随访1年半病情稳定.

关键词: 溃疡性结肠炎; 甲状腺功能亢进症

陈文科, 邹兵, 叶红军, 张智翔. 溃疡性结肠炎合并甲状腺功能亢进症1例. 世界华人消化杂志 2008; 16(28): 3246-3247
http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3246.asp

■同行评议者
张晓岚, 教授, 河北医科大学第二医院消化内科

0 引言
溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)与甲状腺功能亢进症(hyperthyroidism, 简称甲亢)发病均与自身免疫反应有关, 但两者合并存在罕见. 我们收治1例溃疡性结肠炎合并甲状腺功能亢进症患者, 现报道如下.

1 病例报告
患者, 女, 59岁, 退休电焊工人, 因“反复排黏液血便10年, 加重1 wk”入院. 患者10年前无明显诱因排黏液血便, 每天2-3次, 行结肠镜检查后诊断为“溃疡性结肠炎”, 予柳氮磺胺吡啶片(4 g/d)治疗, 症状反复. 1 wk前黏液血便增多, 每天4-5次. 既往于15年前出现怕热、多汗、消瘦症状, 在外院经血清学和颈部超声等检查(具体检查结果不详), 诊断为“甲状腺功能亢进症”, 口服药物治疗2年, 效果欠佳, 症状反复发作, 遂行甲状腺次全切, 仍症状反复, 间断服用丙基硫氧嘧啶治疗. 家族中多人有“甲状腺功能亢进症”病史. 入院体查: T 36.5℃, P 84 次/min, 颈前区见横行手术瘢痕, 正中可触及一大小约3 cm结节, 腹平软, 左下腹轻压痛, 无反跳痛, 肝脾未及, 肠鸣音6 次/min. 结肠镜检查: 横结肠、降结肠、乙状结肠、直肠黏膜广泛充血、水肿、糜烂, 考虑溃疡性结肠炎. 大便常规: WBC 5-10/HP, RBC 5-20/HP, 大量黏液, 隐血试验阳性. 血清甲状腺功能: 游离T_3 3.39(参考值1.45-3.48) ng/L, 游离T_4 24.9(参考值7.1-18.5) ng/L, 超敏促甲状腺素0.005(参考值0.47-4.64) mIU/L. 免疫功能: 血清总补体58.9(参考值23-46) kU/L, 补体C_3 1.86(参考值0.8-1.8) g/L, 补体C_4 0.43(参考值0.12-0.38) g/L, IgG、IgM、IgA正常. 血常规、肝功能、肾

功能、电解质、血沉、CA199、CEA正常, 大便培养无致病菌生长. 甲状腺彩超: 颈前囊实混合性团块, 异位甲状腺组织并部分囊性变? 请普通外科会诊, 建议手术, 但患者拒绝, 要求药物控制治疗. 诊断: 溃疡性结肠炎(复发型, 活动期, 中型, 广泛性结肠炎)、甲状腺功能亢进症. 予以强的松(40 mg/d)、柳氮磺胺吡啶(4 g/d)*po*, 地塞米松(10 mg/d)灌肠, 丙基硫氧嘧啶(150 mg/d)抗甲亢及支持对症治疗后病情好转出院. 出院时无特殊不适, 大便棕黄色, 质软, 1-2次/d, 大便常规WBC、RBC为0/HP, 隐血试验阳性. 出院后继续口服药物治疗, 病情稳定, 药物逐渐减量. 随访至今1年半, 目前维持强的松(5 mg/d)、柳氮磺胺吡啶(0.75 g/d)、丙基硫氧嘧啶(50 mg/d). 大便1-2次/d, 多为黄色软便, 复查大便常规和隐血试验正常. 无怕热、多汗症状, 血清甲状腺功能检查基本正常, 甲状腺彩超检查较住院时无明显改变.

2 讨论

溃疡性结肠炎是一种病因尚不十分清楚的直肠和结肠慢性非特异性炎性疾病, 其发生一般认为与自身免疫反应有关. 可伴有多种肠外表现, 包括关节炎、结节性红斑、坏疽性脓皮病、巩膜外层炎、前葡萄膜炎、口腔复发性溃疡、原发性硬化性胆管炎、淀粉样变性等. 肠外表现国外报道有40%-50%, 而我国较少见. 2006年中国炎症性肠病协作组对全国3100例住院溃疡性结肠炎患者的调查中[1], 434例患者(14.0%)具有肠外表现, 包括关节痛(7.1%)、皮肤病变(1.9%)、口腔溃疡(1.9%)、眼部病变(1.7%)、肛瘘(0.55%)、肛周脓肿(0.42%)、肛裂(0.39%). 甲状腺功能亢进症(甲亢)为自身免疫性疾病, 与溃疡性结肠炎合并存在病例少见, 国内目前尚未见报道, 国外报道在溃疡性结肠炎患者中甲亢的发生率为0.8%-3.7%[2-3], 在甲亢患者中溃疡性结肠炎的发生率为1.3%[4]. 甲亢多发生于溃疡性结肠炎之前, 也可同时或后于其出现[2-3,5], 本例患者甲亢先于溃疡性结肠炎出现. 虽然两者发病均与自身免疫功能紊乱有关, 但两者之间在发病机制上有无联系目前尚不明确, 不过有学者认为两者间可能存在以下共同之处: 心理应激、遗传因素、免疫因素. 在治疗上, 国外有学者认为, 两者病情相互影响, 甲亢可加重溃疡性结肠炎患者的肠道症状, 影响溃疡性结肠炎的治疗效果, 反之亦然, 因而治疗上需两者同时并重[6-7]. 本患者溃疡性结肠炎和甲亢症状均反复发作, 可能与两者未同时并重治疗并达到病情有效控制有关. 患者住院后我们两种疾病同时予以并重治疗, 病情得到好转出院. 遗憾的是患者颈前囊实混合性团块不愿意进行手术, 病变性质不能病理明确. 病情目前追踪1年半时间良好, 但长远效果有待继续追踪观察.

■同行评价

本文报道病例罕见, 国内尚属首次, 值得关注.

3 参考文献

1 中国炎症性肠病协助组, 王玉芳, 欧阳钦. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析. 中华消化杂志 2006; 26: 368-372

2 Triantafillidis JK, Cherakakis P, Zervakakis A, Theodorou M. Coexistence of hyperthyroidism and ulcerative colitis: report of 4 cases and a review of the literature. *Ital J Gastroenterol* 1992; 24: 494-497

3 Järnerot G, Azad Khan AK, Truelove SC. The thyroid in ulverative colitis and Crohn's disease. II. Thyroid enlargement and hyperthyroidism in ulcerative colitis. *Acta Med Scand* 1975; 197: 83-87

4 Pereţianu D, Dumitrescu C, Lotreanu V. Association of hyperthyroidism and ulcerative colitis. Report of two cases. *Med Interne* 1990; 28: 41-45

5 Nishimura M, Yamamoto T, Iijima H, Moriwaki Y, Takahashi S, Hada T. Basedow's disease and chronic ulcerative colitis: a case report and review of the Japanese literature. *Intern Med* 2001; 40: 44-47

6 Pai S, Mehta R, Rao G. Thyrotoxicosis co-existing with ulcerative colitis. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24: 263-264

7 Modebe O. Autoimmune thyroid disease with ulcerative colitis. *Postgrad Med J* 1986; 62: 475-476

编辑 李军亮 电编 何基才

• 致谢 •

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 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!

白爱平 副教授
南昌大学第一附属医院消化内科

陈红松 副研究员
北京大学人民医院肝病研究所

陈积圣 教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

戴冬秋 教授
中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

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

范学工 教授
中南大学湘雅医院感染病科

冯志杰 主任医师
河北医科大学第二医院消化内科

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

黄恒青 主任医师
福建省第二人民医院消化内科

黄晓东 副主任医师
武汉市中心医院消化内科

刘冰熔 教授
黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科

刘改芳 主任医师
河北医科大学第三医院消化内科

刘海林 主任医师
上海交通大学医学院附属第九人民医院消化科

刘连新 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科

梅林 教授
北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室

倪润洲 教授
南通大学附属医院消化内科

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院消化内科

孙诚谊 教授
贵阳医学院附属医院院长办

孙殿兴 主任医师
白求恩国际和平医院肝病科

王炳元 教授
中国医科大学附属第一医院消化内科

王正康 教授
北京中日友好医院普外科

王志刚 副主任医师
上海市第六人民医院普外科

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

杨建民 教授
浙江省人民医院消化内科

杨维良 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外三科

殷正丰 教授
中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院

喻荣彬 副教授
南京医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系

张继明 教授
复旦大学附属华山医院肝炎研究室

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系