

# 论著

文章编号: 1000-5404(2008)01-0070-05

## 柳氮磺胺吡啶诱导 HSC-T6 肝星状细胞凋亡及其机制

朱慧利<sup>1</sup>, 沈薇<sup>1</sup>, 陈忠勇<sup>2</sup> (1重庆医科大学附属第二医院消化科, 重庆 400010; 2四川省凉山彝族自治州第二人民医院肝胆外科, 四川 西昌 615000)

**摘要:** 目的 观察柳氮磺胺吡啶及其分解产物对肝星状细胞株 HSC-T6 增殖和凋亡的影响, 并对其分子机制作初步探讨。方法 用 CCK-8 比色法检测细胞增殖; 流式细胞术 AnnexinV-FITC/PI 双染检测 HSC-T6 细胞凋亡率; AO/EB 染色法观察细胞凋亡形态, Western blot 检测 NF- $\kappa$ B、P- $\text{IKK}$ 、P- $\text{I}\kappa\text{B}$  蛋白的表达, 激光共聚焦显微镜观察 P65 核转位。结果 柳氮磺胺吡啶能剂量依赖性的抑制 HSC-T6 肝星状细胞的增殖; AO/EB 染色法、AnnexinV/PI 染色结果证明柳氮磺胺吡啶能诱导 HSC-T6 肝星状细胞的凋亡; 而 5-氨基水杨酸和磺胺吡啶对 HSC-T6 的增殖和凋亡无影响。Western blot 结果表明柳氮磺胺吡啶不是 5-氨基水杨酸和磺胺吡啶抑制  $\text{IKK}$ 、 $\text{I}\kappa\text{B}$  的磷酸化、细胞核 NF- $\kappa$ B P65 的表达 ( $P < 0.05$ )。激光共聚焦显微镜下观察到, 柳氮磺胺吡啶组 P65 核转位被抑制。结论 柳氮磺胺吡啶可抑制 HSC-T6 的增殖并诱导凋亡, 其机制可能与其抑制 Rel/NF- $\kappa$ B/ $\text{I}\kappa\text{B}$ / $\text{IKK}$  信号通路有关。

**关键词:** 柳氮磺胺吡啶; HSC-T6; 增殖; 凋亡; 核因子

中图分类号: R322.47; R965; R975.6

文献标识码: A

## Apoptosis of hepatic stellate cells induced by sulfasalazine

ZHU Hui-li<sup>1</sup>, SHEN Wei<sup>1</sup>, CHEN Zhong-Yong<sup>2</sup> (1Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010; 2Department of Hepatobiliary Surgery, Second People's Hospital of Liangshan, Xichang 615000, Sichuan, China)

**Abstract:** Objective To determine whether sulfasalazine stimulates hepatic stellate cell (HSC-T6) apoptosis and its possible mechanism. Methods CCK-8 assay, acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) and Annexin FITC/PI were used to determine cell growth and cell apoptosis. The expression of NF- $\kappa$ B, phospho- $\text{IKK}$  and phospho- $\text{I}\kappa\text{B}$  was detected by Western blotting. The nuclear translocation of HSC-T6 P65 was observed with laser confocal microscopy. Results Sulfasalazine displayed a strong growth inhibition and promoting apoptosis effect on HSC-T6 cells in a dose and time-dependent manner. Sulfasalazine, but not 5-aminosalicylic acid or sulfapyridine, inhibited the activation of NF- $\kappa$ B by down-regulating the expressions of P- $\text{IKK}$ , P- $\text{I}\kappa\text{B}$  and the nuclear translocation of P65. Conclusion Sulfasalazine can inhibit NF- $\kappa$ B activity and promote apoptosis in HSC-T6 cells, where the Rel/NF- $\kappa$ B/ $\text{I}\kappa\text{B}$ / $\text{IKK}$  pathway plays an important role in HSC survival.

**Key words:** sulfasalazine; HSC-T6; apoptosis; proliferation; NF- $\kappa$ B

柳氮磺胺吡啶 (Sulfasalazine, SASP) 从 20 世纪 40 年代由 5-氨基水杨酸 (5-aminosalicylic acid, 5-ASA) 和磺胺吡啶 (sulfapyridine, SPY) 通过偶氮键合成了柳氮磺胺吡啶, 主要用于治疗克隆病和溃疡性结肠炎。近来有研究表明柳氮磺胺吡啶可以通过阻止  $\text{IKB}$  激酶复合物 ( $\text{IKK}$  和  $\text{IKK}$ ) 而选择性抑制 NF- $\kappa$ B<sup>[1]</sup>。我们在前期工作中, 已经证实柳氮磺胺吡啶能抑制 HSC-T6 的增殖, 诱导其凋亡; 而对人正常肝细胞株 L02 的增殖和凋亡无影响。本实验进一步对比观察柳氮磺胺

吡啶及其分解产物 5-氨基水杨酸和磺胺吡啶对 HSC-T6 增殖和凋亡的影响, 确定其有效的药物成分, 并探讨其可能的机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

大鼠肝星状细胞株 HSC-T6 购自北京肿瘤研究所; 柳氮磺胺吡啶、5-氨基水杨酸、磺胺吡啶为美国 Sigma 公司产品, 少量二甲基亚砜 (DMSO) 溶解药物, 配成 0.1 mmol/L 的贮存溶液, -20℃ 保存。临用时以培养液稀释, DMSO 终浓度  $< 0.1\%$ 。Cell Counting Kit-8 Assay (CCK-8 试剂盒) 为碧云天产品; AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒为南京凯基产品; 兔抗鼠的 NF- $\kappa$ B P65 亚单位、磷酸化  $\text{IKK}$ 、磷酸化  $\text{IKB}$ 、Western Blot 发光试剂盒均购自美国 Santa Cruz 公司。其余试剂为国产 (分析纯)。

作者简介: 朱慧利, 女, 四川省仁寿县, 硕士研究生, 主要从事肝纤维化方面的研究。电话: 13452172028, E-mail: zhuhuil2006@sohu.com

通信作者: 沈薇, E-mail: shenwei315@163.com

收稿日期: 2007-09-04; 修回日期: 2007-10-10

## 1.2 实验方法

1.2.1 单细胞悬液的制备 将大鼠肝星状细胞株 HSC-T6,接种于无菌培养瓶内,加入含 10%胎牛血清、 $8 \times 10^4$  U/L庆大霉素 RPMI 1640培养液,置入 37 ℃含 5% CO<sub>2</sub>饱和湿度的温箱内松盖培养,至对数增长期,用 0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA 混合水化液 3 min,终止反应,吹打,制成单细胞悬液。细胞计数板准确计数,调整细胞浓度到  $1 \times 10^5$  个/ml,待用。

1.2.2 实验分组 分别设立对照组(不加药物而加含 2.5% 血清的培液),0.1% DMSO 对照组(不加药物而加含 2.5% 血清的培液中含 0.1% 的 DMSO),柳氮磺胺吡啶处理组(SASP):加入浓度分别为 0.5、1、2 mmol/L 的 SASP;5-氨基水杨酸处理组(5-ASA):加入浓度分别为 0.5、1、2 mmol/L 的 5-ASA;磺胺吡啶处理组(SPY):加入浓度分别为 0.5、1、2 mmol/L 的 SPY;5-氨基水杨酸+磺胺吡啶处理组(5-ASA+SPY):加入浓度 2 mmol/L 5-ASA+2 mmol/L SPY 的等比例混合溶液。

1.2.3 Cell Counting Kit-8 Assay (CCK-8 试剂盒)测定细胞增殖 基本操作步骤:制备好单细胞悬液,细胞按  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 6 个 96 孔培养板内(弃周围一圈,改加 PBS,防止水分丢失)每孔 100  $\mu$ l,重复九孔,每组均设一个空白或药物对照组(只加药物或培养基,没有细胞)。37 ℃孵箱中培养 48 h,待细胞贴壁后,弃掉原培养基,向每孔加入含药培养基 100  $\mu$ l,置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱内培养 24 h。作用 24 h 后,加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8,在培养箱内培养 60 min 后,在酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度 [D(490)] 值。实验重复 3 次。

1.2.4 膜联蛋白(Annexin-V)碘化丙啶(PI)双标记流式细胞术检测细胞凋亡率 收集细胞,PBS 漂洗 2 次,用 10  $\mu$ l Annexin-V 和 5  $\mu$ l PI 进行染色,避光作用 10 min 后,将细胞置激发光为 488 nm 波长的 FACS Calibur 型流式细胞仪检测,上机测定时获取  $2 \times 10^5$  个以上细胞,重复两次。用 ModFit LT 软件分析结果。染色后将细胞分为 3 个亚群:活细胞细胞膜完整,磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)无外化,为 Annexin-V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>亚群;早期凋亡细胞细胞膜完整,PS 外化,为 Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>亚群;晚期凋亡或坏死细胞细胞膜不完整,PS 外化,为 Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>亚群。

1.2.5 AO/EB 染色观察凋亡形态 取对数生长期细胞,加入不同浓度的药物,设立对照组和 0.1% DMSO 对照组以及各处理组(同上),作用 24 h,分别收集各组细胞。各取 1 ml 100  $\mu$ g/ml 的 AO、EB 等量混合,将各组细胞调整为  $1 \times 10^{10}$  个/L 细胞悬液,吸取 95  $\mu$ l 细胞悬液,加 5  $\mu$ l 的 AO/EB 混合液,吸一滴点于洁净的玻璃片上,直接用盖玻片封片,3 min 内荧光显微镜下观察拍照,蓝光,510 nm 激发波长。

1.2.6 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B p65、磷酸化 IKK、磷酸化 I $\kappa$ B 的表达 细胞核蛋白和细胞浆蛋白的提取采用 Santa Cruz 公司方案。WB 细胞裂解液裂解细胞,BCA 法检测蛋白浓度,-70 ℃冻存。以每泳道 80  $\mu$ g 上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转至硝酸纤维膜,各加入 NF- $\kappa$ B p65、磷酸化 IKK、磷酸化 I $\kappa$ B 一抗(1:10 稀释),再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000),采用 Western Lightning 化学发光剂显色。凝胶成像分析仪进行图像分析,将每个样本的积分光密度值与  $\beta$ -actin

的积分光密度值相比,得出积分光密度的比值,以比值代表它们的蛋白含量。

1.2.7 NF- $\kappa$ B 分子标记和激光共聚焦显微镜观察 采用 6 孔培养板中的细胞。实验分组为 A 组:对照组;B 组:TNF- $\alpha$  组(TNF- $\alpha$  150 U/ml 作用 30 min);C 组:SASP 组(2 mmol/L);D 组:TNF- $\alpha$  + SASP 组(先加 SASP 作用 60 min 后,再加 TNF- $\alpha$  作用 30 min)。用 4% 的多聚甲醛固定细胞 10 min, PBS 洗 2 次,将细胞片置 0.5% Triton X-100,37 ℃细胞穿孔 10 min, PBS 洗 3 次,每次 10 min。正常山羊血清 37 ℃封闭 30 min,加入 10  $\mu$ l TNF- $\kappa$ B p65 抗体(一抗)(1:100 稀释),在室温下避光孵育 2 h, PBS 洗 2 次,加入 5  $\mu$ l 抗兔 IgG-FITC(二抗),室温避光孵育 30 min, PBS 洗 2 遍,经体积分数 90% 的甘油封片,立即置于激光共聚焦显微镜下观察,激光共聚焦显微镜的参数为:针孔倍数 pinhole:1.0;扫描层数:10;40 倍物镜。

## 1.3 统计学处理

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析及 Dunnett-*t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 柳氮磺胺吡啶及其分解产物对 HSC-T6 增殖作用的影响

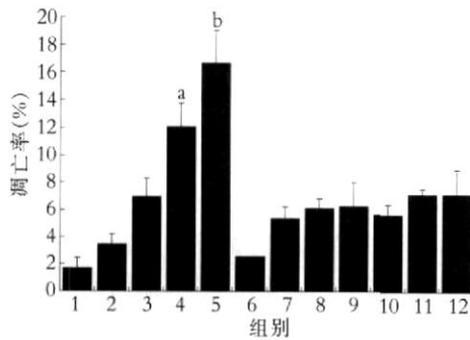
CCK-8 法显示,不同浓度的柳氮磺胺吡啶对 HSC-T6 细胞的增殖均具有明显抑制作用,随浓度的增加,抑制作用增强。SASP 0.5、1、2 mmol/L 组 D(490) 分别为 (0.524  $\pm$  0.044)、(0.402  $\pm$  0.069) 和 (0.113  $\pm$  0.055),细胞对照组为 (0.61  $\pm$  0.09),而 DMSO 对照组为 (0.606  $\pm$  0.105),差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。不同浓度的 5-氨基水杨酸、磺胺吡啶以及二者的等比例混合物作用 HSC-T6 细胞 24 h 后,对 HSC-T6 增殖无明显影响。5-ASA 0.5、1、2 mmol/L 组 D(490) 分别为 (0.684  $\pm$  0.089)、(0.841  $\pm$  0.092) 和 (0.628  $\pm$  0.092); SPY 0.5、1、2 mmol/L 组 D(490) 分别为 (0.697  $\pm$  0.122)、(0.586  $\pm$  0.145) 和 (0.584  $\pm$  0.128); 5-ASA + SPY 组 D(490) 为 (0.578  $\pm$  0.279),与 DMSO 对照组相比,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 Annexin V/PI 双染法细胞凋亡检测结果

柳氮磺胺吡啶、5-氨基水杨酸、磺胺吡啶作用 HSC-T6 细胞 24 h 后,0.5、1、2 mmol/L 的柳氮磺胺吡啶组凋亡率 (%) 分别为 (6.96  $\pm$  0.39); (12.09  $\pm$  1.56); (16.72  $\pm$  2.98); 细胞对照组为 (1.74  $\pm$  0.31); DMSO 组为 (3.42  $\pm$  0.41); 其中 DMSO 组与细胞对照组相比,差异无显著性。各柳氮磺胺吡啶处理组与 DMSO 组相比差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。2 mmol/L 浓度组出现凋亡晚期改变 (Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> 亚群),不同浓度 5-氨基水杨酸、磺胺吡啶对 HSC-T6 细胞凋亡率与对照组相比,差别无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 1)。

### 2.3 细胞凋亡形态的观察

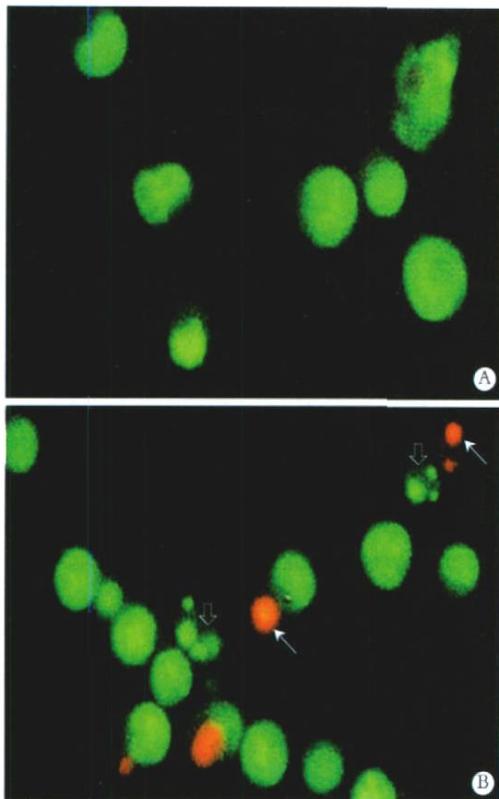
高倍镜下 ( $\times 400$ ),正常的细胞饱满、细胞膜光滑、发光均匀,为完整、同形的绿染的细胞核(图 2A)。早期凋亡的细胞形状不规则,为固缩状或囊泡状绿色,也有完整的细胞核,晚期凋亡细胞呈完整或不完整的橙红色。1 mmol/L 的柳氮磺胺吡啶作用于 HSC-T6 24 h 后,细胞即发生凋亡的形态学改变(图 2B)。



1:正常对照组; 2: DMSO对照组; 3-5分别为 0.5、1、2 mmol/L SASP处理组; 6-8分别为 0.5、1、2 mmol/L 5-ASA处理组; 9-11分别为 0.5、1、2 mmol/L SPY处理组; 12: 5-ASA + SPY处理组

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与 DMSO对照组比较

图1 柳氮磺胺吡啶及其分解产物对 HSC-T6凋亡的影响

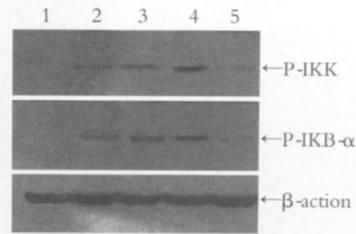


A: 正常对照组; B: 1 mmol/L SASP处理组; : 晚期凋亡; ∇: 早期凋亡

图2 AO/EB荧光染色观察 HSC-T6的形态学变化 (荧光显微镜 ×400)

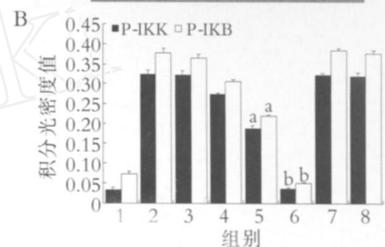
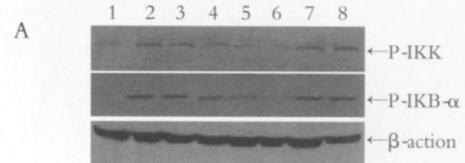
### 2.4 柳氮磺胺吡啶对转录因子 IKK、IKB- 磷酸化的调控

Western blot结果显示,加入 TNF- $\alpha$  20 min后, IKK、IKB- 的磷酸化水平开始升高,进一步激活 60 min达到最高水平,之后磷酸化水平开始下降(图3)。所以我们选取 60 min作为之后检测药物干预磷酸化 IKK、IKB- 表达的作用时间。药物干预 60 min后,再加 TNF- $\alpha$  激活 60 min后发现,不同浓度的柳氮磺胺吡啶组的 IKK、IKB- 的磷酸化水平较对照组都有所降低,而高浓度 5-氨基水杨酸、磺胺吡啶对 IKK、IKB- 的磷酸化水平与对照组相比无差别(图4A、B)。



1-5 分别为 TNF- $\alpha$  刺激 HSC-T6 0、20、30、60、120 min

图3 TNF- $\alpha$  刺激 HSC-T6 不同时间后磷酸化 IKK、IKB- $\alpha$  蛋白水平的表达



A: Western blot 条带; B: 定量分析

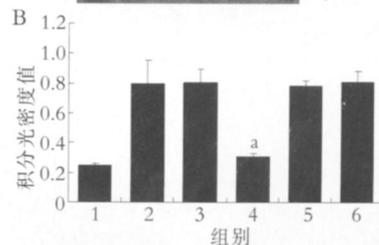
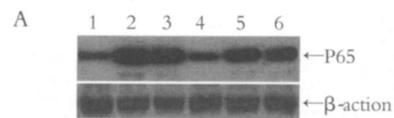
1: DMSO 对照组; 2: TNF- $\alpha$  刺激组; 3: TNF- $\alpha$  + DMSO 处理组; 4-6 分别为 0.5、1、2 mmol/L SASP + TNF- $\alpha$  处理组; 7: 2 mmol/L 5-ASA + TNF- $\alpha$  处理组; 8: 2 mmol/L SPY + TNF- $\alpha$  处理组

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与 DMSO 对照组比较

图4 柳氮磺胺吡啶及其分解产物处理 HSC-T6 后磷酸化 IKK、IKB- $\alpha$  蛋白水平的表达

### 2.5 柳氮磺胺吡啶对 HSC-T6 核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 活性的影响

2.5.1 Western blot 结果 如图5可知, 2 mmol/L 柳氮磺胺吡啶干预细胞后, 再加 TNF- $\alpha$  进一步激活, 细胞核 NF- $\kappa$ B 蛋白水平较对照组明显减少 ( $P < 0.05$ ), 而 5-氨基水杨酸、磺胺吡啶组细胞核 NF- $\kappa$ B 蛋白水平与对照组比较无明显差异 ( $P > 0.05$ )。



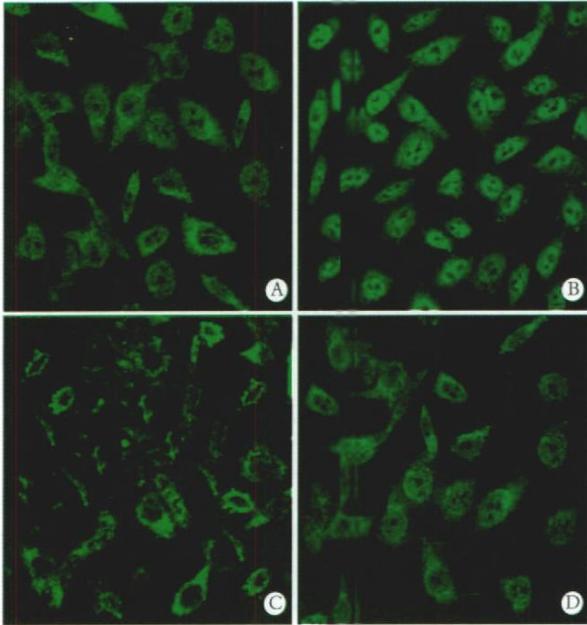
A: Western blot 条带; B: 定量分析

1: DMSO 对照组; 2: TNF- $\alpha$  刺激组; 3: TNF- $\alpha$  + DMSO 处理组; 4: 2 mmol/L SASP + TNF- $\alpha$  处理组; 5: 2 mmol/L 5-ASA + TNF- $\alpha$  处理组; 6: 2 mmol/L SPY + TNF- $\alpha$  处理组

a:  $P < 0.05$ , 与 DMSO 对照组比较

图5 柳氮磺胺吡啶及其分解产物处理 HSC-T6 后细胞核 NF- $\kappa$ B P65 蛋白水平的表达

2.5.2 激光共聚焦显微镜观察 可见 HSC-T6细胞株 P65 (未处理组)少量位于细胞核,主要位于细胞质(图 6A),TNF- 与 HSC-T6共同培养 60 min后,迅速发生核转位,细胞核内 P65 明显增多(图 6B),而单独加柳氮磺胺吡啶干预 30 min后,没有观察到明显的 P65核转位现象(图 6C);柳氮磺胺吡啶预先干预 30 min后,再加 TNF- 处理 60 min,与 TNF- 干预组相比 HSC-T6P65核转位明显减少(图 6D)。



A:对照组;B: TNF- 组;C: SASP组;D: SASP TNF- 组

图 6 免疫荧光法观察各组 HSC-T6 P65的表达  
(激光共聚焦显微镜  $\times 400$ )

### 3 讨论

肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC)是肝脏产生细胞外基质的主要来源,其大量增殖和凋亡相对不足在肝纤维化的发生中起核心作用。越来越多的研究表明,HSCs活性和增殖与其凋亡受到抑制有关,而NF- B能抑制多种类型的细胞凋亡,其在静止态HSCs中并无活性,但在激活态HSCs中,活性却持续存在<sup>[2]</sup>。因此有理由相信NF- B可能通过抑制HSCs的凋亡,而使活化的HSCs数量维持在相当的水平,最终导致肝纤维化发生。

柳氮磺胺吡啶作为治疗炎症性肠病的药物,口服吸收后,大约有30%的药物以原药形式进入血液,70%在结肠中被细菌分解为5-氨基水杨酸和磺胺吡啶。常规认为柳氮磺胺吡啶只是作为载体,治疗炎症性肠病的有效成分为5-氨基水杨酸。但是,磺胺吡啶被认为是柳氮磺胺吡啶治疗类风湿关节炎的有效成分。近期有多项研究表明,柳氮磺胺吡啶可抑制NF- B的活化,而5-氨基水杨酸和磺胺吡啶则不能,其机制主要是通过抑制IKK激酶的活化,从而抑制IKB的磷酸化,IKB磷酸化被抑制,使NF- B核转位被抑制<sup>[1,3,7]</sup>。

本实验通过CCK-8法检测增殖、膜联蛋白(An-

nexin-V)碘化丙啶(PI)双标记流式细胞术以及AO/EB染色检测凋亡,证实柳氮磺胺吡啶可抑制HSC-T6细胞增殖,诱导其凋亡,而柳氮磺胺吡啶的分解产物5-氨基水杨酸、磺胺吡啶以及二者等比例混合物对HSC-T6细胞的增殖和凋亡均无影响。Oakley等<sup>[6]</sup>用柳氮磺胺吡啶干预大鼠原代肝星状细胞和人原代肝星状细胞24h后通过AO/EB染色检测细胞凋亡率,也证实柳氮磺胺吡啶可诱导肝星状细胞的凋亡,而5-氨基水杨酸和磺胺吡啶却不能诱导其凋亡。说明只有柳氮磺胺吡啶作为原药才具有对HSC选择性的抑制增殖和促进凋亡的作用。类似结果在T淋巴细胞以及大鼠巨噬细胞也得到证实<sup>[4,5]</sup>。其作用机制尚不清楚,多数认为柳氮磺胺吡啶的特异性促凋亡作用与其选择性抑制NF- B的活化有关,而同等条件下,5-氨基水杨酸和磺胺吡啶不能抑制HSC-T6细胞NF- B的活化<sup>[4]</sup>。

Western blot和激光共聚焦显微镜结果显示活化的HSC-T6细胞有微弱的磷酸化IKK,磷酸化IKB表达和少量的P65转移到细胞核内。当加入TNF- 与HSC-T6细胞共同培养时显示,从20min开始,磷酸化IKK,磷酸化IKB逐渐增加,60min到达高峰,二者表达几乎同步,而细胞核P65蛋白的表达也伴随增高。激光共聚焦显微镜的观察从形态学上证实HSC-T6经TNF- 处理后发生了明显的NF- B P65核转位。当我们预先加入柳氮磺胺吡啶干预HSC-T6细胞30min后,再给予TNF- 处理时却发现磷酸化IKK,磷酸化IKB含量以及细胞核NF- B P65明显降低,激光共聚焦显微镜也观察到P65核转位被抑制。而5-氨基水杨酸和磺胺吡啶却无此作用。由此可见,TNF- 上调HSC-T6的IKK,IKB磷酸化表达水平,增加P65核转位而激活NF- B,抵抗HSC-T6细胞的凋亡。柳氮磺胺吡啶选择性地阻断TNF- 介导的HSC-T6细胞内IKK,IKB磷酸化表达的增加及P65核转位,抑制NF- B活性,进而诱导HSC-T6细胞凋亡。

我们的研究与Oakley等<sup>[6]</sup>报道的结果一致。Oakley等<sup>[6]</sup>的实验显示柳氮磺胺吡啶可拮抗生长抑制和DNA损伤诱导家族45(GADD45)表达,同时诱导JNK的磷酸化,用JNK的特异性抑制剂SP600125阻断后,柳氮磺胺吡啶的诱导凋亡效应被阻断。GADD45基因是个抑制细胞凋亡的基因,受NF- B调控。近年研究表明NF- B的保护机制主要是通过抑制JNK的级联反应来实现的。GADD45参与了NF- B和JNK之间的通路,它通过抑制MKK7的活性来抑制JNK通路,进而抑制细胞凋亡。因此,我们可以认为柳氮磺胺吡啶诱导HSC凋亡的可能机制为:通过抑制IKK激酶的活化,进而抑制IKB的磷酸化,从而NF- B核转位被抑制。由于NF- B核转位抑制从

而抑制了 GADD45 的表达,其表达的减少解除了对 JNK信号通路的抑制,从而促进肝星状细胞的凋亡。但文献[8]报道,柳氮磺胺吡啶通过非 NF- $\kappa$ B 途径诱导恶性胶质瘤细胞的凋亡;在胆汁酸诱导的肝细胞凋亡中是抗凋亡作用<sup>[9]</sup>。因此柳氮磺胺吡啶治疗作用机制目前存在很多争议,需要进一步深入研究。

我们在前期的研究中发现,柳氮磺胺吡啶对正常肝细胞的增殖和凋亡无影响。综合文献报道,柳氮磺胺吡啶可成为有应用前景的治疗肝纤维化的药物。

### 参考文献:

- [1] Weber C K, Liptay S, Wirth T, *et al* Suppression of NF-kappa B activity by sulfasalazine is mediated by direct inhibition of Ikappa B kinases alpha and beta[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5): 1209 - 1218
- [2] Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, *et al* Nuclear factor kappa B in proliferation, activation and apoptosis in rat hepatic stellate cells[J]. *J Hepatol*, 2000, 33(1): 49 - 58.
- [3] Wahl C, Liptay S, Adler G, *et al* Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(5):

- 1163 - 1174.
- [4] Liptay S, Fulda S, Schanbacher M, *et al* Molecular mechanisms of sulfasalazine-induced T-cell apoptosis[J]. *Br J Pharmacol*, 2002, 137(5): 608 - 620.
- [5] Salh B, Assi K, Huang S, *et al* Dissociated ROS production and ceramide generation in sulfasalazine-induced cell death in Raw 264.7 cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 72(4): 790 - 799.
- [6] Oakley F, Meso M, Iredale J P, *et al* Inhibition of inhibitor of kappaB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(1): 108 - 120.
- [7] Habens F, Srinivasan N, Oakley F, *et al* Novel sulfasalazine analogues with enhanced NF-kappaB inhibitory and apoptosis promoting activity[J]. *Apoptosis*, 2005, 10(3): 481 - 491.
- [8] Hemisson M, Weller M. NF-kappaB-independent actions of sulfasalazine dissociate the CD95L- and Apo2L/TRA L-dependent death signaling pathways in human malignant glioma cells[J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(9): 1078 - 1089.
- [9] Rust C, Baumuller K, Bemt C, *et al* Sulfasalazine reduces bile acid induced apoptosis in human hepatoma cells and perfused rat livers[J]. *Gut*, 2006, 55(5): 719 - 727.

(编辑 郭建秀)

(上接 66页)

男性组中相同的趋势, >60岁以上的老年患者占有检出 MC 的大部分 ( $P < 0.05$ )。52例 MC 中, 并发有结肠息肉 11例, 占 21.1%, 直肠癌 2例。46例便秘患者中, 有 40例有过使用泻药的历史, 最长者用药达 30余年, 最多者可同时用到 4类药物。服药时间与结肠黑变表现出现的早晚及病变的程度没有明显差异 ( $P > 0.05$ ), 用药的种类及数量也没有差异 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 流行病学

MC 过去认为在我国是一种少见病, Billiard 在 1825 年首先描述了结肠黏膜的黑色素沉着现象, 1857 年, Virchow 将其命名为黑变病, 并一直沿用至今。近年来随着电子肠镜的广泛应用, 国内的报道也逐渐增多, 一般认为在国内 MC 发病率大约在 0.06% ~ 5.90%<sup>[11]</sup>。近年来黑变病的发生率呈明显增加的趋势。MC 发病率逐年上升, 可能与人们生活水平提高, 脂肪、蛋白质摄入增加, 纤维素摄入减少, 便秘患者增多, 大量滥用泻剂或者人们的健康意识增加, 自觉要求进行结肠镜检查的人增多有关。过去认为结肠黑变病多发于结肠、阑尾<sup>[2]</sup>, 但综合近年来的有关文献可看出, 黑色变可以累及全结肠任一段, 与本研究总结的情况累及全结肠及局限于左半结肠者最多, 仅累及直肠者最少。

### 3.2 病因研究

MC 的病因至今仍不甚清楚。多数报道认为, 脂肪及蛋白质摄入增加、纤维素摄入减少、便秘、直肠前突、肛直肠反射失调等导致大便困难, 以及滥用泻剂, 尤其是蒽醌类泻剂引起结肠黑变已经被大家所公认<sup>[3]</sup>。蒽醌泻药属于刺激性泻药, 能刺激肠蠕动, 增加肠分泌, 减少吸收, 从而促进排便, 同时可能引致腹部痉挛。患者一旦脱离这类药物, 短期内结肠平滑肌疲劳, 蠕动力下降, 大便在结肠内停留时间过长, 便秘复发,

大部分患者会再次找寻这类药物的帮助, 从而形成一种“便秘-口服泻药-停药-便秘复发或加重-口服泻药”这样一个恶性循环。长期大量服用蒽醌类泻药, 可以引起结肠黏膜上皮细胞凋亡, 产生凋亡小体被巨噬细胞所吞噬, 并通过基底膜小孔移行至黏膜固有层, 在巨噬细胞的溶酶体内, 凋亡小体转化为脂褐素, 随着泻药长期应用, 这些含色素巨噬细胞不断聚集, 形成典型 MC。在学者认为, 泻药应用不是促使 MC 发生的唯一因素<sup>[4]</sup>, 细胞凋亡在 MC 中起主要作用, MC 是细胞凋亡加速的非特异性标志。引起细胞凋亡原因很多, 如衰老等, 这可解释本组患者无论是男性组还是女性组均以 60 岁以上人群的发生率较高。虽然多数研究认为, 蒽醌类泻药是引起结肠黑变的主要原因, 但也有研究认为其他药物也可导致结肠黑变<sup>[5]</sup>, 本研究数据, 46 例便秘患者中, 也有 6 例从未服用过泻药, 但也出现了结肠黑变, 支持 MC 是一多因素作用的结果这个结论。

关键词: 结肠黑变病, 内镜

中图分类号: R574.62 文献标识码: B

### 参考文献:

- [1] 纪小龙, 朱成, 李向红, 等. 结肠黑变病的病理探讨[J]. *中华消化杂志*, 1994, 14(1): 38 - 40.
- [2] 王成林, 林贵. 罕见病少见病的诊断与治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 470.
- [3] 高峰玉, 钱家鸣. 结肠黑变病致病因素的分析[J]. *中华消化杂志*, 2001, 21(5): 306 - 307.
- [4] Byers R J, Marsh P, Parkinson D, *et al* Melanosis coli is associated with an increase in colonic epithelial apoptosis and not with laxative use[J]. *Histopathology*, 1997, 30(2): 160 - 164.
- [5] Lestina L S. An unusual case of melanosis coli[J]. *Gastrointest Endosc*, 2001, 54(1): 119 - 121.

(编辑 栾嘉)