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[1],沈 薇[1],陈忠勇[2] ([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-κB P65、P-IKK、P-IκB 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 IKK、IκB 的磷酸化、细胞核 NF-κB 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-κB/IκB/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

中图法分类号:R322.47;R965;R975.6 **文献标识码**:A

Apoptosis of hepatic stellate cells induced by sulfasalazine

ZHU Hui-li[1], SHEN Wei[1], CHEN Zhong-Yong[2] ([1]Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010; [2]Department 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 Ⅴ FITC/PI were used to determine cell growth and cell apoptosis. The expression of NF-κB P65, phospho-IKK and phospho-IκB 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-κB by down-regulating the expressions of P-IKK, P-IκB and the nuclear translocation of P65. Conclusion Sulfasalazine can inhibit NF-κB activity and promote apoptosis in HSC-T6 cells, where the Rel/NF-κB/IκB/IKK pathway plays an important role in HSC survival.

Key words: sulfasalazine; HSC-T6; apoptosis; proliferation; NF-κB

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 IKB 激酶复合物(IKKα 和 IKKβ)而选择性抑制 NF-κB[1]。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-κB P65 亚单位、磷酸化 IKKα、磷酸化 IKBα、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,四川省仁寿县人,硕士研究生,主要从事肝纤维化方面的研究。电话:13452172028,E-mail:zhuhuili2006@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、8×10^4 U/L 庆大霉素 RPMI1640 培养液，置入 37 ℃ 含 5% CO_2 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，制各成单细胞悬液。细胞计数板准确计数，调整细胞浓度到 1×10^5 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% 血清的培养液中含 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：①制备好单细胞悬液，细胞按 1×10^4 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 μl，重复九孔，每组均设一个空白或药物对照孔（只加药物或培养基，没有细胞）。②37 ℃ 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 μl，置 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 24 h。③作用 24 h 后，加入 10 μl 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 μl Annexin-V 和 5 μl 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 2×10^5 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：①活细胞细胞膜完整，磷酯酰丝氨酸（phosphatidylserine，PS）无外化，为 Annexin-V^-/PI^- 亚群；②早期凋亡细胞细胞膜完整，PS 外化，为 Annexin-V^+/PI^- 亚群；③晚期凋亡或坏死细胞细胞膜不完整，PS 外化，为 Annexin-V^+/PI^+ 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 μg/ml 的 AO、EB 等量混合，将各组细胞调整为 1×10^{10} 个/L 细胞悬液，吸取 95 μl 细胞悬液，加 5 μl 的 AO/EB 混合液，吸一滴点于洁净的玻片上，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-κB P65、磷酸化 IKK、磷酸化 IKB-α 的表达　　细胞核蛋白和细胞浆蛋白的提取采用 Satus Cruzs 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 μg 上样，经 SDS-PAGE 电泳后，电转至硝酸纤维膜，各加入 NF-κB P65、磷酸化 IKK、磷酸化 IKBα 一抗（1∶10 稀释），再加入辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶2 000），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 β-action 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-κB 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-α 组（TNF-α 150 U/ml 作用 30 min）；C 组：SASP 组（2 mmol/L）；D 组：TNF-α + SASP 组（先加 SASP 作用 60 min 后，再加 TNF-α 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 μl NF-κB 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 μl 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

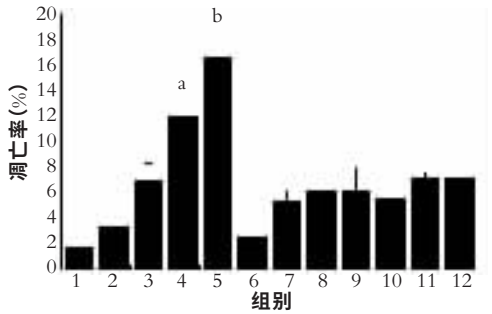
CCK-8 法显示，不同浓度的柳氮磺胺吡啶对 HSC-T6 细胞的增殖均具有明显抑制作用，随浓度的增加，抑制作用增强。SASP 0.5、1、2 mmol/L 组 D(490) 分别为（0.524 ± 0.044）、（0.402 ± 0.069）和（0.113 ± 0.055），细胞对照组为（0.61 ± 0.09），而 DMSO 对照组为（0.606 ± 0.105），差异有统计学意义（$P<0.05$）。不同浓度的 5-氨基水杨酸、磺胺吡啶以及二者的等比例混合物作用 HSC-T6 细胞 24 h 后，对 HSC-T6 增殖无明显影响。5-ASA 0.5、1、2 mmol/L 组 D(490) 分别为（0.684 ± 0.089）、（0.841 ± 0.092）和（0.628 ± 0.092）；SPY 0.5、1、2 mmol/L 组 D(490) 分别为（0.697 ± 0.122）、（0.586 ± 0.145）和（0.584 ± 0.128）；5-ASA + SPY 组 D(490) 为（0.578 ± 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 ± 0.39）；（12.09 ± 1.56）；（16.72 ± 2.98）；细胞对照组为（1.74 ± 0.31）；DMSO 组为（3.42 ± 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^+/PI^+ 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

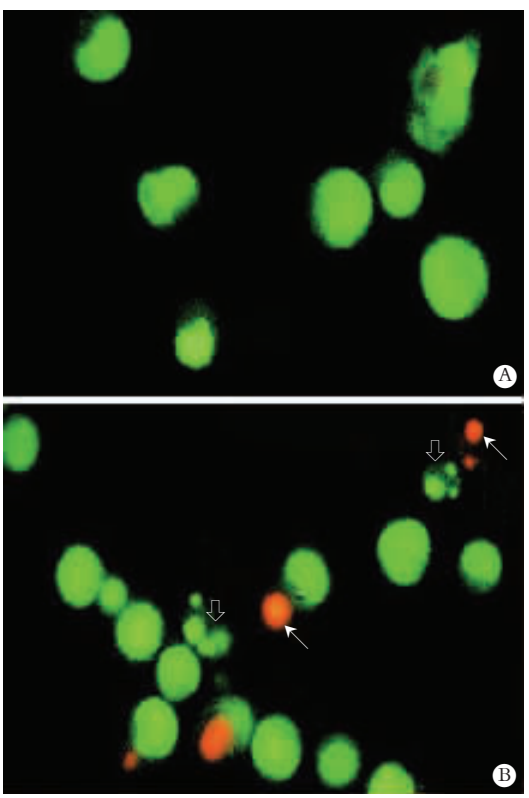
高倍镜下（×400），正常的细胞饱满、细胞膜光滑、发光均匀，为完整、同形的绿染的细胞核（图 2A）。早期凋亡的细胞形状不规则，为固缩状或囊泡状绿色，也有完整的细胞核，晚期凋亡细胞呈完整或不完整的橙红色。1 mmol/L 的柳氮磺胺吡啶作用于 HSC-T6 24 h 后，细胞即发生凋亡的形态学改变（图 2B）。



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

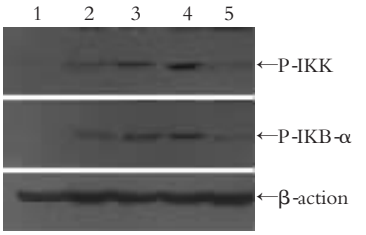


A：正常对照组；B：1 mmol/L SASP 处理组；↑：晚期凋亡；⇩：早期凋亡

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

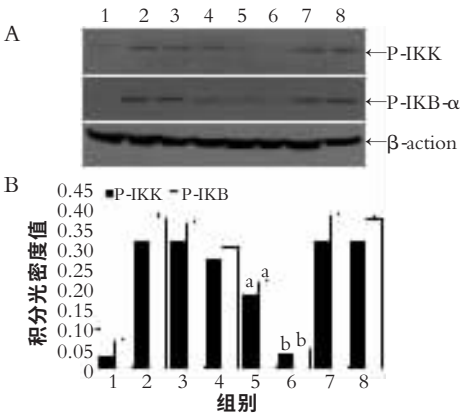
2.4 柳氮磺胺吡啶对转录因子 IKK、IKB-α 磷酸化的调控

Western blot 结果显示，加入 TNF-α 20 min 后，IKK、IKB-α 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-α 表达的作用时间。药物干预 60 min 后，再加 TNF-α 激活 60 min 后发现，不同浓度的柳氮磺胺吡啶组的 IKK、IKB-α 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-α 的磷酸化水平与对照组相比无差别（图4A、B）。



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

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



A：Western blot 条带；B：定量分析

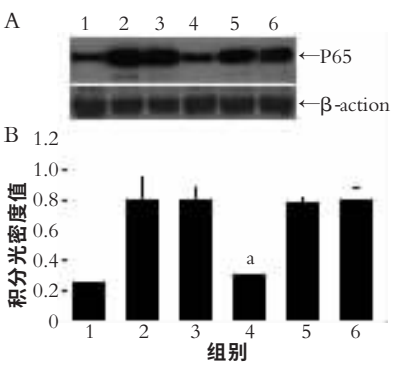
1：DMSO 对照组；2：TNF-α 刺激组；3：TNF-α＋DMSO 处理组；4－6 分别为 0.5、1、2 mmol/LSASP＋TNF-α 处理组；7：2 mmol/L 5-ASA＋TNF-α 处理组；8：2 mmol/L SPY＋TNF-α 处理组

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-α 蛋白水平的表达

2.5 柳氮磺胺吡啶对 HSC-T6 核转录因子-κB（NF-κB）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-α 进一步激活，细胞核 NF-κB 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-κB 蛋白水平与对照组比较无明显差异（$P>0.05$）。



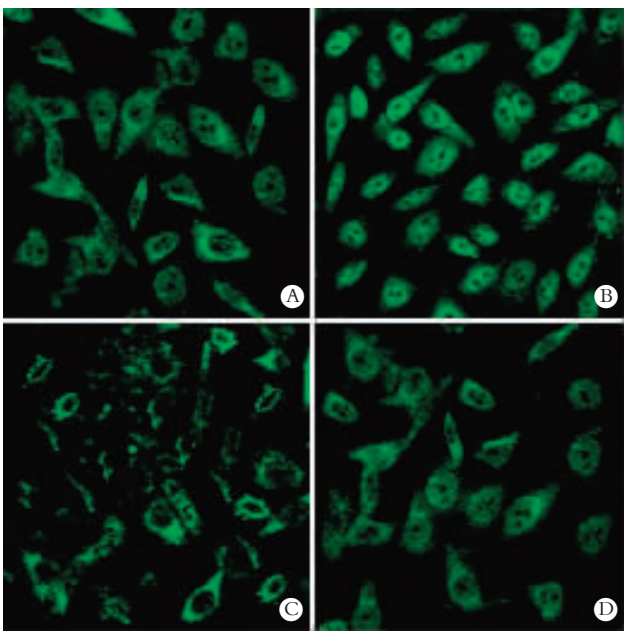
A：Western blot 条带；B：定量分析

1：DMSO 对照组；2：TNF-α 刺激组；3：TNF-α＋DMSO 处理组；4：2 mmol/L SASP＋TNF-α 处理组；5：2 mmol/L 5-ASA＋TNF-α 处理组；6：2 mmol/L SPY＋TNF-α 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-κB 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-α 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-α 处理 60 min，与 TNF-α 干预组相比 HSC-T6P65 核转位明显减少（图 6D）。



A：对照组；B：TNF-α 组；C：SASP 组；D：SASP TNF-α 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 ×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-κB 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[2]。因此有理由相信 NF-κB 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-κB 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-κB 核转位被抑制[1,3,7]。

本实验通过 CCK-8 法检测增殖、膜联蛋白（Annexin-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[6] 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 24 h 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[4,5]。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-κB 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-κB 的活化[4]。

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-α 与 HSC-T6 细胞共同培养时显示，从 20 min 开始，磷酸化 IKK、磷酸化 IKB 逐渐增加，60 min 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-α 处理后发生了明显的 NF-κB P65 核转位。当我们预先加入柳氮磺胺吡啶干预 HSC-T6 细胞 30 min 后，再给予 TNF-α 处理时却发现磷酸化 IKK、磷酸化 IKB 含量以及细胞核 NF-κB 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-α 上调 HSC-T6 的 IKK、IKB 磷酸化表达水平，增加 P65 核转位而激活 NF-κB，抵抗 HSC-T6 细胞的凋亡。柳氮磺胺吡啶选择性地阻断 TNF-α 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-κB 活性，进而诱导 HSC-T6 细胞凋亡。

我们的研究与 Oakley 等[6] 报道的结果一致。Oakley 等[6] 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 45β（GADD45β）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。GADD45β 基因是个抑制细胞凋亡的基因，受 NF-κB 调控。近年研究表明 NF-κB 的保护机制主要是通过抑制 JNK 的级联反应来实现的。GADD45β 参与了 NF-κB 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 IκB 的磷酸化，从而 NF-κB 核转位被抑制。由于 NF-κB 核转位抑制从

而抑制了 GADD45β 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-κB 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[9]。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] Hermisson M, Weller M. NF-kappaB-independent actions of sulfasalazine dissociate the CD95L- and Apo2L/TRAIL-dependent death signaling pathways in human malignant glioma cells[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(9): 1078 – 1089.

[9] Rust C, Bauchmuller K, Bernt 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所有检出 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,Billiarrd 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,并一直延用至今。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%[1]。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[2],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,以及滥用导泻剂,尤其是蒽醌类导泻剂引起结肠黑变已经被大家所公认[3]。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,蠕动能力下降,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[4],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[5],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

中图法分类号: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)