

- 26 Sharma BK, Santana IA, Wood EC, et al. Intra-gastric bacterial activity and nitrosation before, during, and after treatment with omeprazole. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1984;289:717-719.
- 27 Rammer M, Kirchgatterer A, Höbling W, et al. Lansoprazole-associated collagenous colitis: a case report. *Z Gastroenterol* 2005;43:657-660.
- 28 Hilmer SN, Heap TR, Eckstein RP, et al. Microscopic colitis associated with exposure to lansoprazole. *Med J Aust* 2006;184:185-186.
- 29 Lowe DO, Mamdani MM, Kopp A, et al. Proton pump inhibitors and hospitalization for *Clostridium difficile*-associated disease: a population-based study. *Clin Infect Dis* 2006;43:1272-1276.
- 30 Cunningham R, Dale B, Undy B, et al. Proton pump inhibitors as a risk factor for *Clostridium difficile* diarrhea. *J Hosp Infect* 2003; 54:243-245.
- 31 Hodges D. More evidence links use of proton pump inhibitors to *C. difficile*. *Medical Post* 2006;42:6.
- 32 Beri R, Michael P, Colin W, et al. Is proton pump inhibitor (PPI) therapy a risk factor for *C. difficile* infection? *Gastroenterology* 130(4, Suppl.2): A384-A385.
- 33 Rai R, Rai S. Pseudomembranous colitis requiring surgical intervention following triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *ANZ J Surg* 2002; 72:917-919.
- 34 Harsch IA, Hahn EG, Konturek PC. Pseudomembranous colitis after eradication of *Helicobacter pylori* infection with a triple therapy. *Med Sci Monit* 2001;7:751-754.
- 35 Buhling A, Radun D, Muller WA, et al. Influence of anti-*Helicobacter* triple therapy with metronidazole, omeprazole and clarithromycin on intestinal microflora. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15:1445-1452.
- 36 Jenkins L. The prevention of *Clostridium difficile* associated diarrhoea in hospital. *Nurs Times* 2004;100:56-7,59.

(收稿日期:2007-04-20)

(本文编辑:王继德)

·综述·

肝星状细胞凋亡机制研究进展

韦始亮¹ 综述 叶红军² 审校

众所周知,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的激活及细胞外基质(extracellular matrix, EMC)的大量产生是肝纤维化的中心环节。因此,寻找促进肝星状细胞凋亡的途径是防治肝纤维化的重要策略。本文就目前对HSC凋亡机制的研究做一综述。

一、肝星状细胞凋亡的常见通路

1. 死亡受体介导的凋亡通路

死亡受体(death receptors, DR)是细胞表面一类能结合胞间凋亡刺激分子并可信号传至胞内引起细胞凋亡的受体,隶属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族。其结构上含有一个由60~80个氨基酸组成的称为“死亡结构域”(death domain, DD)的胞内区。胞外的死亡信号可通过死亡受体(DR)转入胞内。目前已知的死亡受体有六种,包括TNFR1、CD95、DR3、DR4、Dik5和DR6,其中研究较为深入的死亡受体为CD95(Fas/Apo1)。Fas相关的死亡结构域(Fas-associated death domain, FADD)蛋白分子除了包含DD结构外,同时含死亡效应结构域(death effector domain, DED)。一般情况下FasL分子以同三聚体形式和三个Fas分子交联,导致Fas的DD成簇,后者结合FADD,形成死亡诱导信号复合体

(death-inducing signal complex, DISC)。随后,FADD通过其DED结构域和caspase-8的DED区相互作用,导致caspase-8形成寡聚体,并驱使其自身活化。活化的caspase-8进一步活化效应caspase,使细胞发生凋亡^[1]。Fas介导的细胞凋亡敏感的细胞分为两种:Fas I型细胞和Fas II型细胞^[2]。肝星状细胞属于Fas II型细胞,通过线粒体膜电势的消失,线粒体膜通透性增高,细胞色素C释放,细胞色素C与Apaf-1、caspase-9前体、ATP/dATP形成凋亡体(apoptosome),然后召集并激活caspase-3,进而引发caspase级联反应,导致细胞凋亡。

2. 线粒体相关的凋亡诱导途径

近年研究表明,线粒体在细胞凋亡过程中扮演重要角色,其诱导凋亡途径主要与线粒体膜通透性转运孔(mitochondrial permeability transition pore, MPT)开放有关^[3]。正常情况下线粒体表现为内负外正的线粒体跨膜电位(mitochondrial transmembrane potential),几乎所有的诱导剂引起各种类型的细胞发生凋亡时都伴随线粒体跨膜电位的下降^[4],而跨膜电位的维持至少部分依赖MPT。MPT由定位于线粒体内外膜之间的一组蛋白复合体组成,包括外周苯二氮唑受体(peripheral benzodiazepine receptor)、亲环素D等。他们的构像改变明显影响MPT的开关状态,而他们的构像受到多种配体和多肽类物质的影响。在生理情况下,MPT呈周期性开放,使线粒体外室的质子进入基质,从而防止质子在外室过

作者单位:1 515031 汕头大学医学院

2 518036 北京大学深圳医院消化内科

度蓄积,而MPT的持续开放和关闭则分别诱导和抑制细胞凋亡。在某种因素的作用下,线粒体MPT开放,外膜破坏并释放细胞色素C、凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)等凋亡相关分子,他们可直接进入细胞核中,导致染色体浓缩、断裂而导致细胞凋亡^[5]。

3. 内质网相关的凋亡诱导途径

研究提示^[6], caspase-12的前体分子主要定位ER(endoplasmic reticulum)膜表面,可能与ER介导细胞凋亡有关。在brefeldin A、tunicamycin、钙离子通道剂A23187等因素作用下,ER膜表面的前体caspase-12活化并释放至胞浆中,激活的caspase-12可进一步剪切caspase-3而引发细胞死亡。

4. 其他凋亡诱导途径

除上述3种经典凋亡诱导途径外,还有神经生长因子(NGF)途径和PBR(the peripheral-type benzodiazepine receptor)途径。前者诱导HSC凋亡的可能机制是受损肝细胞表达的NGF与活化HSC表达的p75结合在HSC膜上,促进p75诱导HSC的活性,从而促进了HSC的凋亡^[7];后者主要通过蛋白激酶B/Akt和Bad的脱磷酸化,下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达等机制,激活有关caspase酶进入凋亡级联反应^[8]。近年来更有研究发现泛素-蛋白酶体途径在肝星状细胞凋亡中起重要作用^[9,10]。它是一种高效蛋白降解途径,主要负责真核细胞内蛋白质的选择性降解。对人肝细胞LX-2和从正常大鼠分离纯化并培养活化的HSC给予蛋白酶体抑制剂-硼替左米和MG132后均可诱导其凋亡,且LX-2凋亡对两种抑制剂显示出明显的浓度和时间依赖性。关于该途径机制,现认为主要与以下4点有关:①减少活化NF- κ B的产生和释放;②影响HSC细胞周期;③干扰TGF β 信号通路;④影响凋亡相关蛋白。

可以看出各种细胞凋亡途径并非单独存在,其中caspase的活化是不同细胞凋亡途径中共同的下游事件。

二、细胞凋亡的调控

1. p53的调控作用

p53蛋白是一种包含393个氨基酸的转录因子,活性形式为四聚体。在正常状态的细胞中,p53的胞浆含量受细胞严密的监控。其中,HDM2(human double minute-2)是细胞调控p53的最主要的负反馈分子^[11]。也就是说,p53的胞浆HDM2基因的启动子而上调HDM2的表达,而HDM2反过来调控p53的功能;p53主要作用于细胞周期的G1期、G2/M期和G0-G1-S-Rb等检查点,并引起细胞周期停滞,其中G1期研究较为清楚。细胞周期在G1期、G2/M期的停滞为细胞DNA的修复提供了时间,一旦修复失败,p53则在其他因素的配合下有效地诱导细胞凋亡。Bennett M等^[12]研究发现,P53可以通过Fas来介导细胞凋亡。P53的激活可迅速增加人血管平滑肌细胞表面Fas(CD95)的表达,这种增加的表达是从高尔基复合体输出到细胞膜表面的。高尔基复合体的破坏可阻断p53诱导的Fas(CD)的表达和细胞的凋亡。p53也可以诱导Fas-FADD的结合并使细胞对Fas诱导的凋亡迅速敏感化。p53还可直接上调Bax的表达,下调Bcl-2的表达,促进细胞凋亡。

2. Bcl-2家族蛋白的调控作用

Bcl-2家族成员主要包含两大结构域,即位于羧基端的跨膜结构域(transmembrane region, TM)和数量不等(1~4个)的Bcl-2同源结构域(Bcl-2 homology, BH)。Bcl-2家族对细胞凋亡的调节作用,一方面表现在Bcl-2亚家族分子,如Bcl-XL等可以通过BH4结构域与Apaf-1结合,从而阻止后者对caspase-9的活化,而BH3亚家族如Bik等,则与Bcl-XL结合而抑制上述活性;另一方面,由于含有BH1、BH2结构域,Bcl-2和Bax亚家族可以在细胞器(如线粒体等)膜上形成性质不同的孔道,从而保护或破坏该细胞器。事实上,Bcl-2与Bcl-XL能够抑制线粒体PT开放和维持线粒体跨膜电位,相反,Bcl-Xs则阻止Bcl-XL和细胞色素C的结合。Bcl-XL也能够减轻线粒体膜间的质子积聚,防止线粒体外膜的肿胀和破裂^[13]。已知线粒体的破坏可以两种途径促使细胞死亡,一种是释放Cyt C和凋亡诱导因子等,活化caspase-9,诱导凋亡,并且可能直接释放储备态caspase-3而诱导凋亡,另一种是由于电子传递链被打断,氧化磷酸化和ATP合成终止,细胞氧化还原电位改变,氧自由基产生,从而直接杀死细胞。

3. 过氧化物酶体增生生物激活受体 γ 及其配体

过氧化物酶体增生生物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)是核激素受体超家族成员,包括PPAR α 、PPAR β 和PPAR γ 三种亚型,分别由不同基因编码,结构、功能各异,其中PPAR γ 可由多种脂肪酸及其衍生物激活,具有多种生物效应^[14]。PPAR γ 在静止的HSC内以活性型形式大量表达,然而无论在体内还是体外,PPAR γ 在活化的HSC内的表达均显著降低;应用合成的PPAR γ 配体能抑制HSC的致肝纤维化作用,而且PPAR γ 在HSC的过度表达还能使HSC由活化型转变为静止期。Cheng Y^[15,16]等在研究姜黄素对HSC行为的影响时发现,在姜黄素诱导HSC凋亡过程中,PPAR γ 表达增加,活性增强;应用PPAR γ 的拮抗剂GW9662干预后,则明显减弱了姜黄素对HSC的促凋亡作用。相反,有实验研究发现,利用PPAR γ 激动剂罗格列酮通过增加活化的HSC中PPAR γ 的表达,从而可减少 α -SMA的表达和I型胶原的合成,并可抑制细胞增殖,促进细胞凋亡^[17]。可见PPAR γ 能够介导HSC凋亡的调节。

4. 参与细胞凋亡的其他相关基因

上述p53、Bcl-2和PPAR γ 均为促进细胞凋亡的调控因素,相反NF- κ B对HSC有抗凋亡效应。活化的HSC表达NF- κ B,该区域有上调的致炎基因如细胞活素、趋化因子和黏附分子。NF- κ B能定向翻译上调的抗凋亡蛋白TRAF-1、TRAF-2、c-IAP1和c-IAP2^[18]。体外实验发现结缔组织生长因子通过活化NF- κ B可以抵抗HSC的凋亡^[19],而NGF、姜黄素及IGF-1则通过下调NF- κ B从而诱导HSC凋亡^[20]。

综上所述,肝星状细胞凋亡机制较为复杂,仍需不断研究发掘,为靶向诱导HSC凋亡在药物应用上提供充分的理论基础。目前,国内外对中药诱导HSC凋亡的研究实验已逐渐展开,而中药具有多层次、多靶点的抗纤维化作用,且副作用少,价格低廉,拥有广阔的前景,值得我们深入研究和实践。

参考文献

- 1 Saile B, Knittel T, Matthes N, et al. CD95/CD95L-mediated apoptosis of the hepatic stellate cell. A mechanism terminating uncontrolled hepatic stellate cell proliferation during hepatic tissue repair. *Am J Pathol* 1997;151:1265-1272.
- 2 Brumatti G, Yon M, Castro FA, et al. Conversion of CD95 (Fas) Type II into Type I signaling by sub-lethal doses of cycloheximide. *Exp Cell Res* 2008;314:554-563.
- 3 Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-1312.
- 4 Park EJ, Zhao YZ, Kim J, et al. A ginsenoside metabolite, 20-O-beta-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol, triggers apoptosis in activated rat hepatic stellate cells via caspase-3 activation. *Planta Med* 2006;72:1250-1253.
- 5 Joza N, Susin SA, Dugas E, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001;410:549-554.
- 6 Grondin M, Marion M, Denizeau F, et al. Tributyltin induces apoptotic signaling in hepatocytes through pathways involving the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;222:57-68.
- 7 陈新, 王玉珍, 修贺明, 等. 神经生长因子在肝纤维化大鼠肝星状细胞凋亡中的作用. *中华医学杂志* 2006;86:1985-1988.
- 8 Shen H, Fan J, Minuk G, et al. Apoptotic and survival signals in hepatic stellate cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007;32:726-734.
- 9 张永进, 方步武. 蛋白酶体抑制剂诱导肝星状细胞凋亡的研究进展. *中华肝脏病杂志* 2007;15:878-880.
- 10 Anan A, Baskin-Bey ES, Bronk SF, et al. Proteasome inhibition induces hepatic stellate cell apoptosis. *Hepatology* 2006;43:335-344.
- 11 Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 1998;95:5-8.
- 12 Bennett M, Macdonald K, Chan SW, et al. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 1998;282:290-293.
- 13 Jenkins CE, Swiatonowski A, Power MR, et al. Pseudomonas aeruginosa-induced human mast cell apoptosis is associated with up-regulation of endogenous Bcl-xS and down-regulation of Bcl-xL. *J Immunol* 2006;177:8000-8007.
- 14 Owen GI, Zelent A. Origins and evolutionary diversification of the nuclear receptor superfamily. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:809-827.
- 15 成扬, 平键, 刘成, 等. 姜黄素激活过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ 信号对大鼠肝星状细胞基质金属蛋白酶 2、9 活性和胞核核因子- κ Bp65 表达的影响. *中国中西医结合杂志* 2007;27:439-443.
- 16 Cheng Y, Ping J, Xu LM. Effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and nuclear translocation/redistribution in culture-activated rat hepatic stellate cells. *Chin Med J (Engl)* 2007;120:794-801.
- 17 Guo YT, Leng XS, Li T, et al. Effect of ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on the biological characters of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2005;11:4735-4739.
- 18 杨湘怡, 陈维雄. 肝星状细胞凋亡调控因素的研究进展. *国际消化病杂志* 2007;27:118-120.
- 19 Gao R, Brigstock DR. Activation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) by connective tissue growth factor (CCN2) is involved in sustaining the survival of primary rat hepatic stellate cells. *Cell Commun Signal* 2005;3:14.
- 20 Saile B, DiRocco P, Dudas J, et al. IGF-I induces DNA synthesis and apoptosis in rat liver hepatic stellate cells (HSC) but DNA synthesis and proliferation in rat liver myofibroblasts (rMF). *Lab Invest* 2004;84:1037-1049.

(收稿日期:2008-01-07)

(本文编辑:朱 薇)

·综述·

肿瘤始动的根基——肿瘤干细胞

李鹰飞 综述 肖冰 审校

肿瘤干细胞在肿瘤组织中存在的数量极少,但为肿瘤发生、发展所必需,并具有不断的自我更新和无限的分化潜能。但由于在肿瘤组织中数量极少而且缺乏特异的分子标志而难以捕捉。最近 R. Dulbecco 研究报道^[1],乳腺癌干细胞 LA7 的特性,注射单个 LA7 细胞即可使免疫缺陷鼠生成乳腺癌,

该细胞在体外三维培养中,能分化成与正常乳腺结构和功能类似的导管和腺泡。这些研究很好地阐明肿瘤干细胞的特性,相信会有更多类似鼓舞人心的发现,这将为彻底根治肿瘤指明方向。

一、肿瘤干细胞表面标志

研究肿瘤干细胞最首要和关键的是表面标志的筛选与鉴定。目前已在白血病^[2]和多种实体瘤中(乳腺癌、脑肿瘤、前

作者单位:510515 南方医科大学南方医院消化内科