

雷帕霉素在溃疡性结肠炎患者中应用的临床价值评估

吴慧丽, 张利, 李琨琨, 肖兴国, 肖锋, 罗金键

■背景资料

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 病因、发病机制尚未完全明确, 反复发作型还可出现黏膜癌变, 目前主要用药为美沙拉嗪, 能否找到既能协助有效抗炎反应, 又能在临床治疗上抑制黏膜癌变的药物, 是本研究所探讨的, 其中药物为雷帕霉素。

吴慧丽, 张利, 李琨琨, 肖兴国, 肖锋, 罗金键, 郑州大学附属郑州中心医院消化一科 河南省郑州市 450007
吴慧丽, 主任医师, 主要从事消化内镜诊疗及炎症性肠病的相关研究。

郑州市科研基金资助项目, No. 121PPTGG504-7

作者贡献分布: 吴慧丽负责课题管理及设计; 张利负责数据整理及分析、参与免疫印迹试验操作等; 李琨琨负责病例收集、服药治疗指导及标本预处理等; 肖兴国配合标本预处理及血清送检等; 肖锋进行血清标本的收集及患者的日常护理等; 罗金键进行肠镜操作及镜下标本收集等。

通讯作者: 张利, 主治医师, 450007, 河南省郑州市桐柏路195号, 郑州市中心医院消化一科. baker818@126.com

收稿日期: 2013-03-04 修回日期: 2013-03-24

接受日期: 2013-04-12 在线出版日期: 2013-05-28

Rapamycin for treatment of ulcerative colitis

Hui-Li Wu, Li Zhang, Kun-Kun Li, Xing-Guo Xiao, Feng Xiao, Jin-Jian Luo

Hui-Li Wu, Li Zhang, Kun-Kun Li, Xing-Guo Xiao, Feng Xiao, Jin-Jian Luo, Department of Gastroenterology, Central Hospital of Zhengzhou City, Zhengzhou 450007, Henan Province, China

Supported by: the Zhengzhou Science Research Fund, No. 121PPTGG504-7

Correspondence to: Li Zhang, Attending Physician, Department of Gastroenterology, Central Hospital of Zhengzhou City, 195 Tongbai Road, Zhengzhou 450007, Henan Province, China. baker818@126.com

Received: 2013-03-04 Revised: 2013-03-24

Accepted: 2013-04-12 Published online: 2013-05-28

Abstract

AIM: To assess the effect of mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway inhibitor rapamycin in the management of ulcerative colitis in terms of anti-inflammation and inhibition of malignant transformation.

METHODS: Fifty patients with ulcerative colitis were enrolled, including 35 treated with rapamycin for 10 d on the basis of oral mesalazine and 20 treated with placebo on the basis of oral mesalazine. Ulcer healing was observed by electron colonoscopy. The expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and cyclooxygenase 2 (COX-2) in colonic mucosa and serum levels of proinflammatory factors tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-10 were

determined. In addition, expression of tumor suppressor genes *PTEN*, *PHLPP* and *Rb* was detected.

RESULTS: In the experimental group, three patients discontinued the treatment, including one due to oral ulcer and two due to abdominal pain and exacerbation of bloody stool. Thus, a total of 32 patients completed the study. Compared to the control group, ulcer surface was significantly reduced, the expression of colonic NF- κ B and COX-2 and serum IL-6 were significantly decreased (all $P < 0.05$), and IL-10 level was significantly increased ($P < 0.01$) in the treatment group. In addition, the expression of *PTEN*, *PHLPP* and *Rb* was significantly increased in the treatment group compared to the control group (all $P < 0.01$), although serum TNF- α level showed no statistically significant difference between the two groups.

CONCLUSION: Rapamycin plus mesalazine can relieve inflammation and prevent malignant transformation in ulcerative colitis possibly by inhibiting the Akt/mTOR pathway.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Rapamycin; Ulcerative colitis; Akt/mTOR signal pathway; *PTEN*; *PHLPP*; *Rb*

Wu HL, Zhang L, Li KK, Xiao XG, Xiao F, Luo JJ. Rapamycin for treatment of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(15): 1458-1461 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1458.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i15.1458>

摘要

目的: 研究雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路抑制剂雷帕霉素在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)中的抗炎及抑制癌变的临床价值评估。

方法: 我院55例UC患者, 35例通过在口服美沙拉嗪的基础上加用雷帕霉素治疗10 d后, 对照组20例为口服美沙拉嗪的基础上加用安慰剂, 观察电子结肠镜下溃疡面在治疗

■同行评议者

刘杰民, 副主任医师, 贵州省人民医院消化内科

前后愈合比较, 并检测治疗前后黏膜核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、环氧化酶2(cyclooxygenase 2, Cox2)表达变化, 血清促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)及抑炎因子IL-10变化, 同时检测治疗前后抑癌基因PTEN、PHLPP、Rb的表达变化。

结果: 实验组有1例患者出现口腔溃疡, 2例患者因出现腹痛、排黏液脓血便加重而终止, 余32例完成该研究, 与对照组治疗比较, 其中结肠镜下可见治疗后溃疡面明显减少, 局部黏膜愈合较快; 黏膜核因子NF- κ B(0.116 ± 0.026)、Cox2(0.035 ± 0.12)、促炎因子IL-6(13.25 ± 3.78)表达量明显减低($P < 0.05$), 抑炎因子IL-10(67.23 ± 5.03)检测量增高($P < 0.01$), 抑癌基因PTEN(0.212 ± 0.18)、PHLPP(0.312 ± 0.43)、Rb(0.285 ± 0.15)表达水平明显增高($P < 0.01$), 血清TNF- α (19.24 ± 3.25)无统计学意义。

结论: 雷帕霉素作为免疫抑制剂联合美沙拉嗪可减轻UC炎症反应; 并可通过抑制Akt/mTOR通路预防UC黏膜癌变。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 雷帕霉素; 溃疡性结肠炎; Akt/mTOR信号通路; PTEN; PHLPP; Rb

核心提示: 雷帕霉素作为免疫抑制剂联合美沙拉嗪可减轻溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)炎症反应; 并可通过抑制Akt/mTOR通路预防UC黏膜癌变。

吴慧丽, 张利, 李琨琨, 肖兴国, 肖锋, 罗金键. 雷帕霉素在溃疡性结肠炎患者中应用的临床价值评估. 世界华人消化杂志 2013; 21(15): 1458-1461 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1458.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i15.1458>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因、发病机制尚未完全明确的结直肠慢性非特异性炎症反应, 病变主要累及黏膜及黏膜下层, 促炎及抗炎因子失衡在UC发病过程中起重要作用, 反复发作型还可出现黏膜癌变^[1]. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路与肿瘤发生、发展和转移有关, 其转导的信号通路的异常与多种肿瘤的形成密切相关, 是肿瘤的治疗靶点之一^[2-5]. 对RCC移植动物模型的研究发现^[6], mTOR抑制剂(如雷帕

霉素)与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抑制剂(如苏尼替尼)具有协同抗肿瘤作用. 同时雷帕霉素作为大环类脂类免疫抑制剂在肾移植患者预防排斥反应临床效果显著, 但作为免疫抑制剂应用于UC尚无相关研究, 本研究重在评估雷帕霉素在治疗UC中的抗炎及抑制癌变的临床价值。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2011-03/2012-12在我院消化科治疗并经病理证实为UC患者55例, 其中男15例, 平均年龄50岁 \pm 5岁, 女40例, 平均年龄37岁 \pm 6岁, 其中30例为中度, 9例为重度, 16例为轻度, 本研究所有受试对象均签署治疗同意书, 并做好不良反应应急预案. 电子结肠镜(Olympus), 西罗莫司片(美国Wyeth Pharmaceuticals公司), 细胞裂解液(晶美生物), Western blot试剂盒, 核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、环氧化酶2(cyclooxygenase 2, Cox2)、PTEN、PHLPP、Rb兔抗人一抗, 羊抗兔二抗, Ecl试剂盒(Santa公司), 5 \times 上样buffer, 电泳和电转槽, 底片、显影液和定影液。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法: 实验组: 35例UC, 用药前查结肠镜了解溃疡范围及活动度, 同时结肠镜下取组织行NF- κ B、Cox2、PTEN、PHLPP、Rb蛋白定量检测, 同时检测血清促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)水平, 抑炎因子IL-10水平(血清检测在我院检验中心进行: 郑州市重点检验室), 对照组: 20例同样通过结肠镜了解溃疡范围及活动度, 同时结肠镜下取组织行NF- κ B、Cox2、PTEN、PHLPP、Rb蛋白定量检测, 同时检测血清促炎因子TNF- α 、IL-6水平, 抑炎因子IL-10水平; (2)受试患者在口服美沙拉嗪颗粒1.0 g, 4次/d的基础上, 免费加用西罗莫司片1 mg, 1片/d, 连续10 d, 维持血液浓度5 μ g/L, 服药期间严密观察患者口腔黏膜、腹痛及大便情况, 并检测肝功能及血脂. 对照组在口服美沙拉嗪颗粒1.0 g, 4次/d的基础上加用安慰剂葡萄糖粉; (3)实验组及对照组患者10 d后查结肠镜再次评估溃疡范围及活动度, 临床程度评级: 可分为轻度、中度和重度. 轻度: 患者腹泻4次/d以下, 便血轻或无, 无发热、脉搏加快或贫血, 血沉正常; 中度: 介于轻度和重度之间; 重度: 腹泻6次/d以上, 明显黏液血便, 体温 >37.5 $^{\circ}$ C, 脉搏 >90 次

■研发前沿

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路与肿瘤发生、发展和转移有关, 其转导的信号通路的异常与多种肿瘤的形成密切相关, 是肿瘤的治疗靶点之一, 且作为免疫抑制剂应用于肾移植免疫排斥反应。

■相关报道

目前国内有报道, 雷帕霉素应用于临床协同抗肿瘤, 但对UC预防黏膜癌变尚无类似研究. 其作为免疫抑制剂, 用于肾移植患者, 但对UC的抗炎、抑制免疫同样尚无类似报道, 是本研究重点解决问题。

■创新盘点

探讨雷帕霉素在UC临床应用的双重作用: 抗炎及抗肿瘤作用。抗炎是作为免疫抑制剂, 抗肿瘤是作为雷帕霉素靶蛋白信号通路抑制剂。

表 1 治疗前后血清TNF- α 、IL-6水平和抑炎因子IL-10的变化 ($\mu\text{g/L}$)

临床实验分组	<i>n</i>	TNF- α	IL-6	IL-10
对照组				
□服安慰剂前	20	32.15 \pm 4.26	30.21 \pm 3.58	24.16 \pm 4.02
□服安慰剂后	20	20.46 \pm 3.68	17.35 \pm 4.25	50.25 \pm 3.56
实验组				
□服RAP前	35	34.25 \pm 4.07	32.25 \pm 4.05	22.56 \pm 4.21
□服RAP后	32	19.24 \pm 3.25	13.25 \pm 3.78	67.23 \pm 5.03

TNF: 肿瘤坏死因子; IL: 白介素。

表 2 Western-blot检测NF- κ B、Cox2、PTEN、PHLPP和Rb蛋白的表达

分组	NF- κ B	Cox2	PTEN	PHLPP	Rb
对照组					
治疗前	0.246 \pm 0.028	0.115 \pm 0.20	0.095 \pm 0.20	0.118 \pm 0.25	0.134 \pm 0.11
治疗后	0.205 \pm 0.046	0.106 \pm 0.10	0.085 \pm 0.22	0.115 \pm 0.30	0.129 \pm 0.10
实验组					
治疗前	0.35 \pm 0.054	0.128 \pm 0.09	0.074 \pm 0.17	0.113 \pm 0.45	0.110 \pm 0.12
治疗后	0.116 \pm 0.026 ^a	0.035 \pm 0.12 ^b	0.212 \pm 0.18 ^b	0.312 \pm 0.43 ^b	0.285 \pm 0.15 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组. NF- κ B: 核因子 κ B; Cox2: 环氧化酶2.

/min, 血红蛋白30 mm/h. 同时结肠镜下取组织行NF- κ B、Cox2、PTEN、PHLPP、Rb蛋白定量检测, 同时检测血清促炎因子TNF- α 、IL-6水平, 抑炎因子IL-10水平.

1.2.2 Western blot检测NF- κ B、Cox2、PTEN、PHLPP、Rb蛋白表达: 将收集各类样品在低温下, 加裂解液提取总蛋白, 取400 μL 裂解上清液, Bradford法测定蛋白浓度"每种样品以20 μg 总蛋白上样, 进行12.5%PAGE凝胶电泳, 100 V, 40 min电泳结束后, 取下凝胶25 V电转2 h, 使蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC)膜上, 将NC膜用封闭液封闭非特异性抗体2 h, 加入一抗(兔抗人抗体1:1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 度摇床孵育过夜加入二抗(羊抗兔1:2000)室温孵育1 h, 将NC膜置于ECL(增强化学发光试剂)中反应1-3 min, 暗室中使X线片曝光, 常规方法显影定影, X线片上的条带用图像分析系统进行分析, 测定积分灰度值, 将NF- κ B、Cox2、PTEN、PHLPP、Rb/ β -actin的比值作为蛋白的相对表达量.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 采用SPSS13.0软件, 治疗前后比较采用配对 t 检验, 计数资料采用有序多分类资料秩和检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

35例受试患者在口服美沙拉嗪颗粒1.0 g, 4次/d的基础上, 免费加用西罗莫司片1 mg, 1片/d, 连续10 d, 维持血液浓度5 $\mu\text{g/L}$, 其中有2例出现腹痛、排黏液脓血便加重, 有1例出现口腔溃疡而终止试验, 余32例均完成试验, 其中3例出现血脂异常变化.

Mayo活动指数评分^[7]及疾病活动指数评分减低百分比及有效率^[1]: 结果显示受试组32例评分由8.56 \pm 1.05, 下降至1.23 \pm 0.96, 而对照组为7.56 \pm 2.15, 下降至3.5 \pm 1.48, 两组均有下降 $P < 0.05$, 但两组间下降幅度比较也有显著差异 $P = 0.0073$; 显效率比较, 受试组26/32, 对照组15/20, 在两组显效率上无明显差异.

血清TNF- α 、IL-6水平, 抑炎因子IL-10两组治疗前后比较(表1).

Western blot检测NF- κ B、Cox2、PTEN、PHLPP、Rb蛋白表达/GAPDH与对照组比较(mean \pm SD, $n = 10$)(表2).

3 讨论

UC是一种病因尚不完全明确的肠道非特异性炎症, 其中肠道黏膜免疫系统异常在UC发生发展

■应用要点

指导雷帕霉素的临床治疗, 并了解其最佳血清浓度及临床不良反应, 但需要更多临床资料作为佐证.

中起决定作用, 难治, 易反复发作, 并出现黏膜重度不典型增生及癌变^[8]。

苗新普等^[9]证实, NF- κ B在UC患者肠黏膜组织表达水平高于正常组织, 且随炎症反应加重而增高, 并与肠黏膜病理组织分级呈正相关。本研究试验组在10 d后, NF- κ B表达, 下降幅度与对照组比较 $P = 0.0326$, 下降幅度有统计学意义。Huang等^[10]和Paiotti等^[11]证实, Cox2在UC肠道炎症反应发生中起重要作用, 活动性UC患者表达明显增强, 且与病情严重程度呈正相关。同样在本研究中, 受试组口服雷帕霉素10 d后Cox2表达水平较对照组下降明显 $P < 0.01$, 说明在口服美沙拉嗪颗粒基础上, 加用雷帕霉素, 起到比单用美沙拉嗪颗粒更好的减轻黏膜炎症反应。TNF- α 介导的信号传导主要通过2个结构不同的受体进行: 1型受体(TNFR1)和2型受体(TNFR2), TNFR1的信号的两个方向一个是导致细胞凋亡, 另一个是引起炎症的发生, 这也是TNFR1信号通路的主要特征, 而有关TNFR2可能只是一个传递受体的假说的研究。此次研究发现, TNF- α 表达变化与对照组比较, 无统计学差异, 这可能雷帕霉素在抑制炎症因子生存即TNF- α 促炎作用同时, 可以调控Akt/mTOR通道, 增强TNF- α 诱导不典型增生细胞凋亡; 其中检测血清促炎因子IL-6及抑炎因子IL-10表达差异显示, 同样得出雷帕霉素可通过调节免疫, 减低炎症反应, 上调抑炎因子IL-10的表达水平, 减低促炎因子IL-6的表达, 从而促进溃疡面愈合, 但以上调节分子机制有待进一步研究。

现今公认的新型肠道抑癌基因有: PTEN、PHLPP、Rb, 其中本实验检测到, 受试组加用mTOR通道抑制剂后, 以上抑癌基因表达水平明显升高, 分析可能雷帕霉素调控mTOR通道, 提高PTEN、PHLPP、Rb表达水平, 起到抑制UC结肠黏膜癌变作用, 这与理论: (1)PTEN通过其磷酸酶活性调控Akt/mTOR通路去磷酸化, 发挥肿瘤抑制功能^[12], 同时可调控VEGF发挥肿瘤抑制功能^[13]; (2)PHLPP的缺失导致细胞中的Akt持续磷酸化, 进而导致肿瘤的发生、发展; 恢复结肠癌细胞中PHLPP的表达后, 可抑制结肠癌细胞的异常增殖^[14]; (3)Rb基因去磷酸化是通过结合并阻断某些转录因子的作用而抑制细胞从G₀期进入S期, 阻断细胞转录, 抑制DNA合成^[15], 同

时研究发现, Akt/mTOR磷酸化可引起Rb基因磷酸化, 但其机制尚不完全明确, 一致。

总之, 作为Akt下游分子信号通路, mTOR信号通路抑制剂雷帕霉素作为免疫抑制剂联合美沙拉嗪可减轻UC炎症反应, 并可通过抑制Akt/mTOR通路预防UC黏膜癌变。

4 参考文献

- 霍丽娟, 安丽婷, 师永盛. 美沙拉嗪联合双歧三联活菌治疗溃疡性结肠炎的临床疗效观察. 中华消化杂志 2012; 32: 523-527
- Chan S. Targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR): a new approach to treating cancer. *Br J Cancer* 2004; 91: 1420-1424 [PMID: 15365568 DOI: 10.1038/sj.bjc.6602162]
- 项洪刚, 王强, 胡志前, 徐健, 王伟军, 卫卫然. 人结肠癌组织中EGFR/Grb2/p-mTOR/VEGF的表达的意义. 第二军医大学学报 2009; 30: 775-779
- 肖秀英, 于宝华, 王丽莎, 倪淑娟, 杨晓燕, 朱玉芬. 结肠癌原发及转移灶中PI3K、p-Akt及mTOR的表达及意义. 中国癌症杂志 2011; 21: 247-250
- 张志永, 张谢夫. mTOR与JNK信号通路在人结肠癌HT-29细胞中的作用及相互关系. 世界华人消化杂志 2011; 19: 2735-2740
- Wacheck V. mTOR pathway inhibitors in cancer therapy: moving past rapamycin. *Pharmacogenomics* 2010; 11: 1189-1191 [PMID: 20860456 DOI: 10.2217/pgs.10.113]
- 欧阳钦. 溃疡性结肠炎临床诊断指南. 临床消化病杂志 2007; 19: 4-6
- 李阳, 李飞, 刘文天, 方维丽, 张洁. 溃疡性结肠炎结肠粘膜脱氧核糖核酸甲基转移酶3 a 表达及作用研究. 中华消化杂志 2011; 31: 673-676
- 苗新普, 欧阳钦, 韦红. COX2、PPAR α 和NF- κ B p65在溃疡性结肠炎组织中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2010; 18: 2660-2665
- Huang ZF, Massey JB, Via DP. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human in vitro differentiated macrophages. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 187-194 [PMID: 10810453]
- Paiotti AP, Artigiani Neto R, Forones NM, Oshima CT, Miszputen SJ, Franco M. Immunoreexpression of cyclooxygenase-1 and -2 in ulcerative colitis. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 911-918 [PMID: 17653443]
- 成志勇, 王素云, 卞永生, 温省初, 杨宁, 高晓丽, 韩英, 潘峻. PTEN/Akt/mTOR通路增加K562/ADM细胞化疗敏感性. 基础医学与临床 2012; 32: 49-55
- 成志勇, 潘峻, 牛志云, 梁文同, 贾志强, 颜晓燕, 姚丽, 杨敬慈. PTEN基因转染对白血病细胞VEGF调控作用的影响. 肿瘤 2010; 30: 815-821
- Liu J, Weiss HL, Rychahou P, Jackson LN, Evers BM, Gao T. Loss of PHLPP expression in colon cancer: role in proliferation and tumorigenesis. *Oncogene* 2009; 28: 994-1004 [PMID: 19079341 DOI: 10.1038/onc.2008.450]
- 张凤艳, 张金子, 邹树彪, 程志芬, 才勇, 玄延花. 胃癌组织中p21、p27、p53和Rb的表达及临床意义. 临床与实验病理学杂志 2011; 27: 586-589

■同行评价

本文为临床治疗UC开拓了思路, 为雷帕霉素的临床应用提供了依据, 对指导临床工作具有重要价值。

编辑 田滢 电编 鲁亚静

