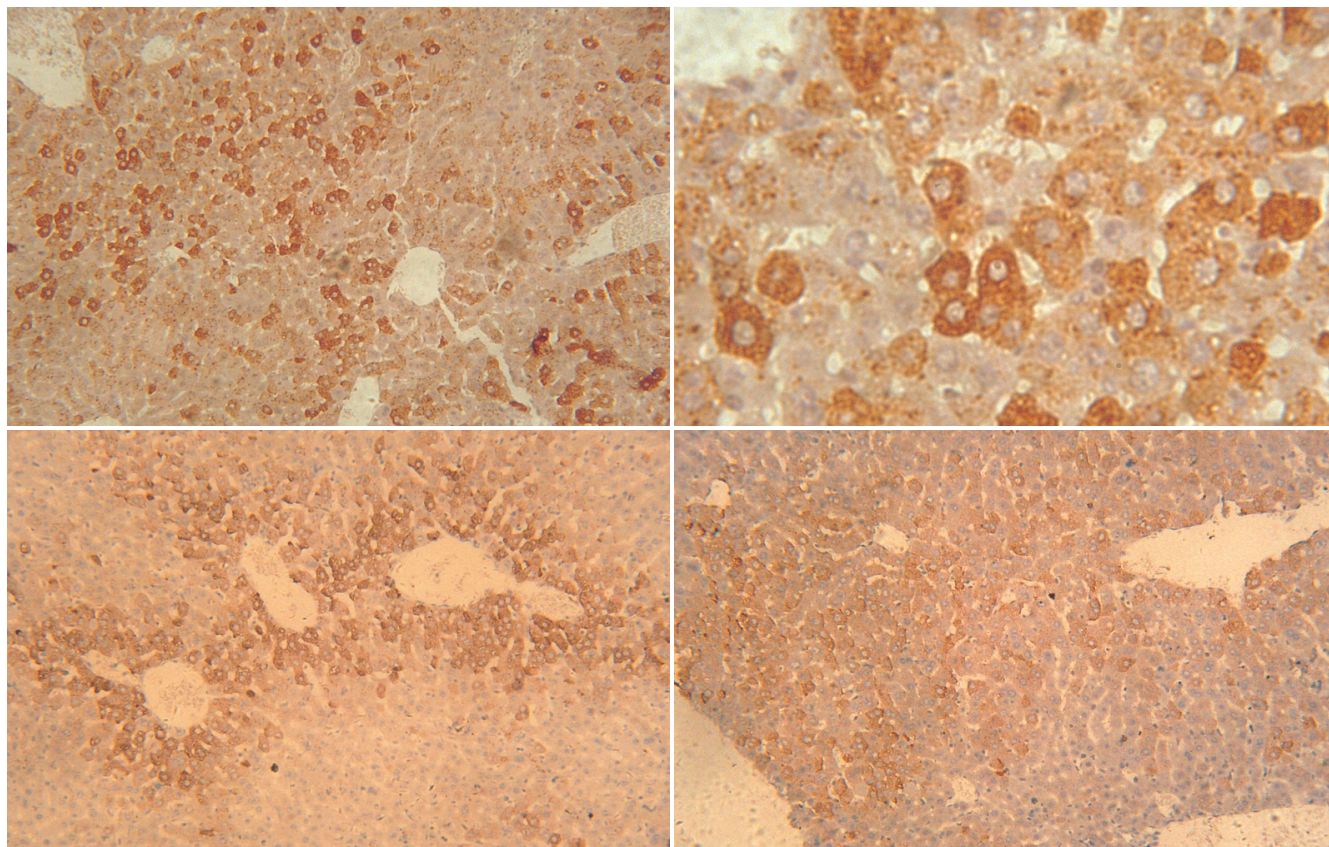


世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 4 月 18 日 第 14 卷 第 11 期 (Volume 14 Number 11)



11 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议，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》，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	北京
黄象谦教授	天津
黄志强教授	北京
裘法祖教授	武汉
王宝恩教授	北京
危北海研究员	北京
吴孟超教授	上海
杨春波教授	福州
周殿元教授	广州

名誉总编辑

潘伯荣教授	西安
-------	----

社长/总编辑

马连生教授	北京
-------	----

副总编辑

陈士葆教授	上海
房殿春教授	重庆
姜洪池教授	哈尔滨
王苑本教授	天津
吴云林教授	上海
徐克成教授	广州
杨思凤教授	吉林
姚希贤教授	石家庄
岳茂兴教授	北京
张万岱教授	广州
周学文教授	沈阳

常务编委

程英升副教授	上海
高毅主任医师	广州
江学良副主任医师	上海
李岩教授	沈阳
刘连新教授	哈尔滨
吕宾教授	杭州
罗和生教授	武汉
聂青和副教授	西安
王小众教授	福州

编委

白爱平主治医师	广州
白文元教授	石家庄
白玉贤教授	哈尔滨

蔡淦教授	上海
曹洁副教授	上海
陈海龙教授	大连
陈红松副研究员	北京
陈积圣教授	广州
陈建荣副教授	南通
陈立波副教授	武汉
陈凇教授	北京
陈其奎教授	广州
陈强谱教授	滨州
陈仕珠主任医师	西安
陈卫昌教授	苏州
陈耀凯副教授	重庆
陈贻胜教授	福州
陈知水教授	武汉
陈治水主任医师	哈尔滨
陈祖林副教授	重庆
程爱国教授	唐山
程红岩教授	上海
迟宝荣教授	长春
崔云甫教授	哈尔滨
代文杰教授	哈尔滨
戴冬秋教授	沈阳
党双锁副教授	西安
邓长生教授	武汉
董蕾教授	西安
杜群副研究员	广州
樊红副教授	南京
范建高教授	上海
范志宁主任医师	南京
房静远教授	上海
傅春彬主任医师	吉林
高成新教授	上海
高春芳研究员	上海
高峰教授	西安
高润平教授	长春
戈之铮教授	上海
龚国忠教授	长沙
龚建平教授	重庆
谷俊朝主任医师	北京
关玉盘教授	北京
管冬元副教授	上海
郭克建教授	沈阳
郭晓钟教授	沈阳
郭新宁教授	银川

韩天权教授	上海
郝俊鸣副主任医师	北京
何超教授	杭州
何裕隆教授	广州
何振平教授	重庆
洪天配教授	北京
侯晓华教授	武汉
黄恒青主任医师	福州
黄金华副教授	广州
黄晓东副主任医师	武汉
黄颖秋教授	本溪
黄裕新教授	西安
黄志勇副教授	武汉
季国忠副教授	南京
季加孚教授	北京
姜慧卿教授	石家庄
蒋龙元副教授	广州
金瑞教授	北京
匡安仁教授	成都
兰平教授	广州
蓝宇教授	北京
劳绍贤教授	广州
李定国教授	上海
李东辉教授	厦门
李方儒教授	天津
李国威教授	西安
李继强教授	上海
李靖副教授	重庆
李奇林教授	广州
李涛主治医师	北京
李晓宇主任医师	北京
李延青教授	济南
李永哲副研究员	北京
李玉民教授	兰州
李增山副教授	西安
李兆申教授	上海
李志霞教授	北京
李宗芳教授	西安
梁力建教授	广州
林勇讲师	上海
刘宝瑞教授	南京
刘冰熔教授	哈尔滨
刘成海研究员	上海
刘平教授	上海
刘杞教授	重庆

世界华人消化杂志®

编辑委员会

刘铁夫教授	哈尔滨	孙学英教授	哈尔滨	许亚平副教授	镇江
刘正稳教授	西安	邵升副教授	哈尔滨	严律南教授	成都
刘作金副教授	重庆	谭学瑞教授	汕头	杨冬华教授	广州
龙致贤教授	北京	唐采白副教授	徐州	杨广顺教授	上海
鲁华玉研究员	北京	唐芙爱教授	郑州	杨建勇教授	广州
陆才德教授	宁波	唐霓副研究员	重庆	杨林副研究员	广州
陆云飞教授	南宁	唐文富主治医师	成都	杨维良教授	哈尔滨
禄韶英主治医师	西安	唐文皓副主任医师	上海	杨希山教授	广州
吕明德教授	广州	唐旭东主任医师	北京	杨云生教授	北京
吕宁主任医师	北京	汤展宏副教授	南宁	姚登福教授	南通
吕云福教授	海口	唐志鹏副研究员	上海	姚树坤教授	石家庄
马大烈教授	上海	田素礼教授	哈尔滨	伊力亚尔·夏合丁教授	乌鲁木齐
茅爱武主任医师	上海	屠红副研究员	上海	阴赅宏研究员	北京
梅林教授	北京	万军教授	北京	于红刚副教授	武汉
孟庆华教授	北京	汪波副主任医师	北京	于健春教授	北京
宁琴教授	武汉	汪思应教授	安徽	于颖彦教授	上海
牛建昭教授	北京	王承党副教授	福州	郁宝铭教授	上海
欧希龙副教授	南京	王春友教授	武汉	喻荣彬副教授	南京
潘林娜教授	哈尔滨	王广义教授	长春	张柏和教授	上海
潘兴华副主任医师	昆明	王吉耀教授	上海	张方信主任医师	兰州
潘秀珍教授	福州	王鲁副教授	上海	张吉翔教授	南昌
彭波副教授	西安	王效民教授	厦门	张锦生教授	上海
彭吉润主任医师	北京	王学美研究员	北京	张军教授	西安
彭曦副研究员	重庆	王正康教授	北京	张青云研究员	北京
彭心宇教授	石河子	王志刚副主任医师	上海	张群华教授	上海
彭志海教授	上海	王忠裕教授	大连	张水军教授	郑州
秦波教授	重庆	卫洪波教授	广州	张绪清副教授	重庆
秦成勇教授	济南	魏经国教授	西安	张学教授	北京
秦环龙教授	上海	魏来教授	北京	张宗明教授	北京
钱建民教授	上海	闻勤生教授	西安	赵桂珍教授	沈阳
秦仁义教授	武汉	吴德全教授	哈尔滨	赵景民教授	北京
卿三华教授	广州	吴建国教授	武汉	赵连三教授	成都
邱双健副教授	上海	吴君主任医师	贵阳	赵平副教授	上海
任超世研究员	天津	吴萍主任医师	徐州	郑民华教授	上海
任建安教授	南京	席启主任医师	大同	智发朝教授	广州
任建林教授	厦门	夏建川研究员	广州	周伯平教授	深圳
邵成浩讲师	上海	向德兵讲师	重庆	周丁华主任医师	北京
邵先玉教授	泰安	肖恩华教授	长沙	周国雄主任医师	南通
邵永孚教授	北京	谢晓华副教授	广州	周士胜教授	大连
沈洪教授	南京	徐爱民副教授	上海	周霞秋教授	上海
沈琳副教授	北京	许春舫主任医师	苏州	周晓东研究员	广州
沈薇教授	重庆	徐存拴教授	新乡	朱春兰主任医师	哈尔滨
施瑞华教授	南京	徐大华副主任医师	北京	朱立元教授	深圳
石统东副教授	重庆	徐德忠教授	西安	朱人敏教授	南京
宋振顺教授	西安	徐列明教授	上海	邹小明教授	哈尔滨
孙诚谊教授	贵阳	徐小元教授	北京	左国营副主任药师	昆明
孙家邦教授	北京	许玲副教授	上海		
孙秀发教授	武汉	许文燮教授	上海		

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2006 年 4 月 18 日 第 14 卷 第 11 期 (总第163期)

述 评

1037 肝纤维化相关因子及其作用

林美屏, 王小众

基 础 研 究

1044 TRF2小干扰RNA载体的构建及表达

宁寒冰, 李继昌, 刘志国, 樊代明

1048 宫内缺氧对子代大鼠脂肪肝发病的影响

苏瑞娟, 吕国荣, 王振华, 李伯义, 刘彦英, 何韶铮, 金鹏

1052 流体动力学法乙型肝炎病毒感染动物模型的建立

应若素, 范学工, 李宁, 朱才, 刘洪波

1058 ASC在大鼠胰腺炎肺损伤发病中的作用及中药清胰汤对其表达的影响

任双义, 陈海龙

1064 用SEREX方法筛选HCC抗原及hcct-19表达谱的检测

陈晓红, 陈智, 陈峰, 姚航平, 夏琦, 焦婧婧

1071 槲皮素对结肠癌HT-29细胞增殖及周期的影响

严兴耘, 彭俊华, 张华欣, 张峰, 卞晓红, 王海忠, 赵涛

文 献 综 述

1077 双歧杆菌定量分析技术研究进展

陈津津, 蔡威

1081 人体与肠道微生物间的互惠共生关系

刘威, 姚文, 朱伟云

1089 HBV与HIV重叠感染及其影响

曹晓沧, 连佳, 吕宗舜

研 究 快 报

1093 转化生长因子 $\beta 1$ 启动子区C-509T位点基因多态性与肝纤维化关系

黄玉波, 魏红山, 董庆鸣, 刘志英, 郭晶晶, 成军, 毛羽

1097 转移特性不同的大肠癌细胞形貌结构的差异分析

余力, 刘莉, 张艳菲, 蔡颖谦, 李祖国, 丁彦青

1103 间接ELISA法对*H pylori*免疫牛初乳中抗体的检测

周冬仁, 王锋, 张常印, 崔山, 唐泰山, 偶健

1107 扑热息痛引起肝细胞损害的机制

田丰, 李岩, 王颖, 吴作艳, 王学清

1111 应用SELDI-TOF-MS技术分析SEB染毒小鼠血清蛋白质组学变化

张靖, 张军, 应天翼, 高川, 宋云扬, 王惠芳

1115 野艾组分对幽门螺杆菌的体外抑菌作用

戴小军, 刘延庆, 陈红菊, 陈群, 严华

临 床 经 验

1119 胆管结石患者术后经“T”管窦道胆道镜Oddi括约肌测压的表现及意义

田忠, 吴硕东, 孔静, 张振海

1124 补脾清肠活血汤对溃疡性结肠炎患者淋巴细胞功能的影响

董文毅, 胡刚正, 郑长青

附 录	1128 世界华人消化杂志投稿须知 1133 世界华人消化杂志作者、读者、编委反馈信息
致 谢	1134 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	1043 NERD及相关疾病国际研讨会 1070 中华消化学会全国第二届炎症性肠病学术会议 1076 第一届北京国际消化内镜高峰论坛 1088 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知 1096 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议 1102 2006广州肝病防治研究新进展学术报告会 1106 第二届全国小肠疾病学术会议 1110 第十五次全国中西医结合肝病学术会议 1118 专家门诊、技法与经验 1123 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 1127 第十二届全国胆道外科学术会议征文通知
封面故事	应若素, 范学工, 李宁, 朱才, 刘洪波. 流体动力学法乙型肝炎病毒感染动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1052-1057 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1052.asp
国 际 会 议	Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006 XXX pan-American congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de anfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com

世界华人消化杂志

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 2006-04-18
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁
中文编辑 潘伯荣 张海宁
电子编辑 张敏 李琪 韩江燕
本期审读 王瑾晖

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

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 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议, 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》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社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。

2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号
82-262

国外代号
M 4481

国内定价
每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

April 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 11

EDITORIAL	<p>1037 Liver cirrhosis associated factors and their roles <i>Lin XP, Wang XZ</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>1044 Construction and expression of telomeric repeat binding factor 2 small interfering RNA eukaryotic vector <i>Ning HB, Li JC, Liu ZG, Fan DM</i></p> <p>1048 Influence of intrauterine hypoxia on pathogenesis of fatty liver in offspring rats <i>Su RJ, Lv GR, Wang ZH, Li BY, Liu YY, He SZ, Jin P</i></p> <p>1052 Development of a hepatitis B virus infection animal model by hydrodynamics <i>Ying RS, Fan XG, Li N, Zhu C, Liu HB</i></p> <p>1058 Role of apoptosis-associated speck-like protein containing a Caspase recruitment domain in pathogenesis of lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats and effect of <i>Qingyitang</i> on its expression <i>Ren SY, Chen HL</i></p> <p>1064 Identification of hepatocellular carcinoma antigens by serological analysis of recombinant cDNA expression library and detection of hcct-19 expression in human tissues and cell lines <i>Chen XH, Chen Z, Chen F, Yao HP, Xia Q, Jiao JJ</i></p> <p>1071 Effects of quercetin on proliferation and cell cycle of colon carcinoma cell line HT-29 <i>Yan XY, Peng JH, Zhang HX, Zhang F, Bian XH, Wang HZ, Zhao T</i></p>
REVIEW	<p>1077 Research progress in quantitative analysis technique for <i>Bifidobacteria</i> <i>Chen JJ, Cai W</i></p> <p>1081 Advance on mutualism of host-microbiota in human gut <i>Liu W, Yao W, Zhu WY</i></p> <p>1089 Super- or co-infection of hepatitis B virus and human immune-deficiency virus <i>Cao XC, Lian J, Lv ZS</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>1093 Polymorphism of C-509T at promoter region of transforming growth factor β1 gene might be related to liver fibrosis <i>Huang YB, Wei HS, Dong QM, Liu ZY, Guo JJ, Cheng J, Mao Y</i></p> <p>1097 Distinction analysis for variance of morphological architecture and different property of metastasis in human colorectal carcinoma cells <i>Yu L, Liu L, Zhang YF, Cai YQ, Li ZG, Ding YQ</i></p> <p>1103 Indirect ELISA in detection of antibodies in colostrums of the cows immunized with <i>Helicobacter pylori</i> <i>Zhou DR, Wang F, Zhang CY, Cui S, Tang TS, Ou J</i></p> <p>1107 Mechanism of acetaminophen-induced hepatocellular injury <i>Tian F, Li Y, Wang Y, Wu ZY, Wang XQ</i></p>

	<p>1111 Application of SELDI-TOF-MS technology in detection of serum proteomic changes of mice exposed to staphylococcal enterotoxin B <i>Zhang J, Zhang J, Ying TY, Gao C, Song YY, Wang HF</i></p> <p>1115 <i>In vitro</i> inhibition of <i>Artemisia Lavandulaefolia</i> DC on <i>Helicobacter pylori</i> <i>Dai XJ, Liu YQ, Chen HJ, Chen Q, Yan H</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>1119 Choledochoscopic manometry research of the sphincter of Oddi motility in bile duct stone patients with a T tube after operation <i>Tian Z, Wu SD, Kong J, Zhang ZH</i></p> <p>1124 Effects of <i>Buqi Qingyi Huoxue Tang</i> on lymphocyte function of patients with ulcerative colitis <i>Dong WY, Hu GZ, Zheng CQ</i></p>
APPENDIX	<p>1128 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>1133 Feedback information from authors, readers and editorial board of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>1134 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Ying RS, Fan XG, Li N, Zhu C, Liu HB.</i> Development of a hepatitis B virus infection animal model by hydrodynamics. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2006;14(11):1052-1057 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1052.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006</p> <p>XXX pan-American congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de anfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx</p> <p>World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com</p>

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date April 18, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjcd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

肝纤维化相关因子及其作用

林羨屏, 王小众

林羨屏, 王小众, 福建医科大学附属协和医院消化内科 福建省福州市 350001

林羨屏, 女, 2004级福建医科大学高教在职硕士研究生, 海南医学院附属医院内科住院医师。

福建省教育厅科研项目, No. JA04198

通讯作者: 王小众, 350001, 福州市新权路29号, 福建医科大学附属协和医院消化内科, drwangxz@pub6.fz.fj.cn

电话: 0591-83357896-8482

收稿日期: 2006-02-09 接受日期: 2006-03-25

摘要

肝纤维化是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复的代偿反应。肝脏在受到外界因素刺激后, 肝组织中肝细胞与Kupffer细胞(KC)分泌可溶性的细胞因子, 通过各自的信号转导途径, 激活星状细胞(HSC)并使之处于持续激活状态, 激活的HSC分泌大量细胞外基质, 使肝脏原有结构被破坏, 形成肝纤维化。肝纤维化是可逆的, 肝纤维化的治疗研究也是围绕着如何降低HSC的活性, 促进HSC凋亡, 减少胶原的生成, 增加其降解, 而这些过程均与细胞因子网络密切相关。

关键词: 肝纤维化; 星状细胞(HSC); 细胞因子; 治疗学

林羨屏, 王小众. 肝纤维化相关因子及其作用. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1037-1043

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1037.asp>

0 引言

肝纤维化是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复的代偿反应, 由于肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)特别是胶原的异常过度沉积, 形成纤维隔, 肝脏原有结构被破坏, 引发肝纤维化。许多慢性肝脏疾病能发展为肝纤维化, 其进一步发展则形成肝硬化。在肝纤维化中起决定性作用的是HSC^[1], 肝组织中的多种细胞如肝细胞、KC分泌可溶性的细胞因子, 通过各自的信号转导途径, 激活HSC并使之处于持续激活状态, 激活的HSC分泌ECM, 纤维化过程的ECM可以说成是细胞因子的储池, 其含有大量致纤维化因子。肝纤维化是可逆的, 纤维化的逆转必然涉及胶原的生成减少、降解增加; 同样肝纤维

化的治疗研究也是围绕着如何降低HSC的活性, 促进HSC凋亡, 减少胶原的生成, 增加其降解, 而这些过程无不与细胞因子网络密切相关。现就肝纤维化和相关因子及其作用作一评述。

1 肝纤维化与星状细胞

1.1 肝纤维化与HSC的激活 肝脏炎症或损伤等因素除直接对肝细胞造成损害外, 还能通过激活KC和单核细胞释放促炎性介质, 包括多肽介质(TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8)、脂类介质(白三烯、血栓素等)和氧自由基造成肝损害。损伤的肝细胞、KC、内皮细胞释放细胞因子, 如转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、血小板衍生生长因子(PDGF)、肝细胞生长因子(HGF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1, IL-6)等, 上述因子均能直接或间接地促进HSC的激活。肥大细胞也与肝脏慢性炎症及肝纤维化有关, 肥大细胞能释放多种细胞因子, 促进纤维化的发生; 能解除地塞米松对HSC的抑制作用, 促进HSC表达干细胞因子(SCF)^[2]; CCl₄介导大鼠肝损伤的研究显示, 肝纤维化阶段巨噬细胞与肌成纤维细胞的量是增加的, 但发展到肝硬化阶段则是下降的, 而这两个阶段肥大细胞的含量却始终是上升的^[3], 说明肥大细胞可能在肝纤维化的进展阶段发挥更为重要的作用。HSC是分泌ECM的主要细胞, 以往称贮脂细胞或Ito细胞, 位于Disse间隙, 是肝内贮存VitA的场所。静息的HSC能产生过氧化物酶体增生物激活受体(PPAR)、瘦素(leptin)等, HSC激活后PPAR表达的下降与leptin的上调可能与纤维化的发生有关^[4-8]。

激活的HSC有如下特点: (1)表达 α -平滑肌动蛋白(α -SMA)、肌细胞增强子-2(myocyte enhancer factor-2)等, 并改变细胞表型分化为肌成纤维样细胞(myofibroblast-like cells)^[9-10]。(2)分泌大量ECM, ECM主要包括: ①胶原: I型, II型, III型, IV型; ②蛋白多糖: 硫酸软骨素、硫酸皮肤素、透明质酸等; ③糖蛋白: 纤维连接蛋白、层黏连蛋白、副层黏连蛋白、副纤维连接蛋白、粗纤维连接素。正常情况下ECM的代谢

■背景资料

肝纤维化是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复代偿反应, 损伤的肝细胞、KC等释放大量的细胞因子, 激活静息的HSC, HSC的持续激活及细胞外基质的大量分泌使肝脏结构破坏并形成纤维化。

■ 研究前沿

肝脏受到损伤和刺激因素的作用后,产生大量的细胞因子,各因子之间又存在着诸多关联.近年来对肝纤维化的研究主要集中在HSC的功能和影响因子、相关的信号转导通路及如何阻断纤维化通路方面,其中主要是肝纤维化相关的生长因子、炎症相关因子和影响血管活性的因子.

保持平衡,HSC分泌ECM的同时,通过抑制基质金属蛋白酶(MMP)和纤溶酶原激活物的表达,促进内皮细胞和HSC表达纤溶酶原激活物抑制因子(PAI-1)和组织金属蛋白酶抑制物(TIMPs),造成肝组织中ECM的生成增多而降解减少,最终导致ECM的大量沉积,发生肝纤维化.(3)具有收缩功能,可调节肝窦血流量和肝内阻力,而激活的HSC收缩性强,是门脉高压形成的重要原因之一.相关研究报道:HSC能表达典型的神经胶质蛋白,产生小囊泡,受自主神经纤维支配^[11];还能表达神经内分泌标志性物质如:神经营养因子、突触素、胶质纤维酸性蛋白,并含有神经递质受体^[12-14].(4)表达PDGF与TGF- β_1 等细胞因子增多,通过自分泌及旁分泌方式进一步激活自身及周围的静息HSC,使肝纤维化进一步发展^[15-16].ERK、PI3K-Akt途径、TGF- β /Smad途径均参与了HSC的激活和致纤维化过程.关于HSC来源,有报道培养的CD34⁺CD38⁻造血干细胞在多种生长因子的作用下,能分化为HSC与肌成纤维细胞,随着肝组织的重构侵入肝组织,说明肝组织损伤过程的成纤维细胞也可以是骨髓原性的^[17].

肝纤维化是可逆的,ECM的生成减少、降解增加,纤维化才可能逆转.肝纤维化的治疗首先要消除病因,去除损伤与刺激因素;利用细胞因子网络,针对纤维化的中心环节进行阻断,降低HSC的活性,促进HSC凋亡,减少胶原的生成,促进胶原降解.HSC的凋亡主要是通过Fas/FasL通路启动的,激活后HSC表达Fas/FasL增加,使其对增殖凋亡信号的敏感性增强,并受Bax, Bcl-2, P53等凋亡调节蛋白的调控.凋亡调节蛋白Bcl-2, P53在静止的HSC中不表达;在转化为肌成纤维样细胞过程中,激活的HSC高表达Bcl-2等凋亡抑制蛋白,使得星状细胞对其他凋亡信号刺激变得不再敏感,而大量增殖.当肝细胞损伤与炎症减轻,组织修复到一定程度,活化的HSC倾向于凋亡,且凋亡的发生随激活的进程、HSC的活化而逐渐增加.同时ECM分泌减少,组织中TIMPs降低, MMP表达上升,纤维溶解增强^[18].

1.2 不同病因引起的肝纤维化 不同的病因引起的肝纤维化的方式可能是不同的.虽然一般情况下,HSC是致纤维化的主要细胞,在胆管周发生损伤为主时,脉管区成肌纤维细胞成为致纤维化的主要细胞.慢性淤胆性疾病如原发性胆汁淤积性肝硬化(PBC), T淋巴细胞与细胞因子

介导永久性胆管损伤,胆管上皮细胞分泌致纤维化因子激活附近脉管区成肌纤维细胞,其沿胆管增殖,分泌ECM,胶原沉积,并最终激活窦周隙HSC,形成纤维间隔.酒精性肝病时,酒精致肠道菌群失调, G 菌群增加,门静脉脂多糖含量上调,其通过CD14/钟罩状受体复合物激活KC,产生活性氧族(ROS)与NADPH氧化酶;氧化产物如氧自由基刺激KC释放TNF- α ,中性粒细胞浸润,还可直接损伤肝细胞使其通过线粒体途径凋亡;代谢产物乙醛与ROS还能直接激活HSC,使其增殖促进纤维化的发生^[19-20].HSC与脉管区成肌纤维细胞的不同在于特异性标志物及对刺激的反应不同^[21].一些病毒(如HCV)蛋白可以直接激活HSC,并在纤维化过程中影响HSC的活性^[22].非酒精性脂肪肝(NASH)是代谢综合征的合并症之一,常常伴有肥胖、2型糖尿病、脂肪代谢紊乱,其不经治疗,易发展为肝纤维化,与脂质过氧化导致的代谢损伤关系密切.

2 肝纤维化相关因子及其作用

2.1 生长因子

2.1.1 TGF- β 转化生长因子 β (TGF- β)有5种亚型,在人及哺乳动物中存在3种亚型,即TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 ,他们有相似的生物学功能,结构上有70%-80%的同源性.TGF- β 是目前研究发现的最强的致纤维化因子,但同时又是抗炎症和免疫抑制因子,他的正常调节功能有利于维持组织自稳.TGF- β 受体有I, II, III型,其中I, II型受体参与TGF- β 的信号转导,III型受体不参与TGF- β 信号转导,但能调节TGF- β 与信号转导受体的结合.II型受体促进凋亡,I型受体则介导ECM的产生,且此作用不受II型受体的影响.TGF- β 在HSC在激活过程中,可使TGF- β II型受体下调,导致其抑制作用减弱;他可活化钙离子通道和Na-H泵,刺激HSC合成并分泌I、III型胶原及纤维结合素,促进ECM的形成.TGF- β 强表达的转基因鼠肝损害后发生了更为严重的肝纤维化,对肝细胞增殖具有强烈的抑制作用,TGF- β 可增加HSC表达PDGF受体,使PDGF促HSC增殖的作用增强,TGF- β 阻断剂可能是有效的肝纤维化治疗手段^[23-25].TGF- β 通过TGF- β /Smad信号转导机制传递胞内信息,其中Smad3是介导Smad/DNA结合所必需的^[26].

2.1.2 EGF 肝纤维化时,表皮生长因子(EGF)表达上调^[27],刺激肝细胞和胆管上皮细胞增殖,并具有促进HSC分裂增殖的能力.激活的HSC在

TGF- β_1 和EGF的直接刺激下, 迁移能力大大提高, 说明HSC能够在分泌释放的生长因子的驱使下向肝脏的各个部位迁移, 扩大了疾病范围, 从而加速了肝纤维化的进程^[28]. EGF的过表达能促使肝细胞发生癌变; EGF2B转基因小鼠可因过表达EGF而诱发肝细胞癌, 同时伴有细胞周期素 D1, B1, c-fos等指标的过表达^[29].

2.1.3 HGF 生理条件下, 肝细胞生长因子(HGF)具有肝营养功能, 促进肝再生的作用, 能抑制TGF- β_1 的表达, 减少前胶原的产生, 降解已形成的胶原纤维及抑制肝细胞凋亡, 刺激肝再生, 从而提高生存率^[30]. DMN肝纤维化模型研究表明, HGF能作用于激活的HSC与门管区成肌纤维细胞, 通过抑制ERK磷酸化途径, 阻止其生长, 促进门管区肌成纤维细胞凋亡, 从而有助于纤维化的恢复^[31]. 经证实HGF基因的转导抑制了DMN诱导的TGF- β_1 的表达, 改善肝纤维化^[32].

2.1.4 PDGF 血小板衍生生长因子(PDGF)是原癌基因的表达产物, 最初从血小板颗粒中分离得到. 静息的HSC几乎不表达PDGF及其受体(PDGFR), 肝脏受损时, 巨噬细胞、血小板、浸润的炎症细胞、受损的内皮细胞及激活的HSC, 均可分泌PDGF, 他是已知最强的促HSC增殖、分化的细胞因子; HSC激活早期的重要标志就是PDGFR表达的增加. PDGF由A, B两条肽链组成, 分别位于第7、22号染色体, 形成PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB 3种亚型; 近年来发现的PDGF家族的另一形式: PDGF-C, 其促有丝分裂活性要强于PDGF-AA, 与PDGF-BB、PDGF-AB的活性相当或有更强的有丝分裂活性. PDGF-C转基因小鼠发生了严重的肝纤维化甚至肝硬化、肝癌^[33]. PDGFR本质上是酪氨酸激酶, 有 α , β 两种类型. 受体位于胞膜外的部分是PDGF的结合位点, 位于胞内的部分具有酪氨酸激酶活性. PDGFR- α 与三种亚型的PDGF均可结合, PDGFR- β 仅与PDGF-AB, PDGF-BB结合. 而其中PDGF-BB和PDGFR- β 在促纤维化过程中的作用较为突出. 若阻止PDGFR- β 表达, 阻断PDGF的信号转导途径, 能有效抑制星状细胞的增殖和胶原的产生, 并促进其凋亡^[34].

2.1.5 IGF-I 胰岛素样生长因子-I (IGF-I), 是由70个氨基酸组成的单链通过3个二硫键交叉连接而成的多肽, $M_r 70\ 000$, 与胰岛素原有很大同源性, 对组织细胞有胰岛素样作用, 主要由肝脏合成、分泌. IGF家族(IGFs)包括IGF-I和IGF-

II, 后者仅在肿瘤组织中高表达. IGF-I在肝纤维化中具有促纤维化和护肝、抗纤维化的双重作用. 实验发现, IGF-I的生物学作用与其浓度密切相关, 有研究认为, 小剂量的IGF-I在动物实验中, 能减轻肝纤维化, 改善肝功能, 提高肝组织抗氧化损伤的能力及减少胶原的表达, 从而起到抗肝纤维化的作用, 而大剂量时IGF-I则能促进肌成纤维细胞增殖^[35-36]. 人体中存在GH/IGF-I轴, GH调节血清中IGF-I水平, IGF-I又对GH的分泌进行负反馈调节. 肝硬化患者GH/IGF-I轴严重失衡, 出现GH抵抗, GH水平升高, IGF-I水平下降. 在肝硬化早期使用小剂量IGF-I治疗, 能减轻肝纤维化的发生^[37]; IGF-I对肝纤维化大鼠具有抗氧化作用, 能降低过氧化作用中的多种参数的表达^[11].

2.2 炎症相关因子

2.2.1 IL-10 白细胞介素-10(IL-10)是一种主要由Th2细胞产生, 抑制Th1细胞释放细胞因子的免疫调节性细胞因子, 主要对炎症细胞起抑制作用. $M_r 35\ 000-40\ 000$, 前体为178肽, 活性形式为非共价键连接的寡二聚体, 等电点为8.1, 对酸不耐受, pH 5.5处理即可快速灭活, 但在pH 11时仍保持活性. 已有的研究证实内源性IL-10在肝脏慢性炎症和纤维化发展过程中表达增加, IL-10是重要的负反馈调节因子, 其能有效抑制NF- κ B的活性, 通过抑制NF- κ B活性减轻炎症反应, 从而表现抗炎作用; IL-10能抑制KC分泌各种细胞因子, 还可直接影响中性粒细胞等炎症细胞活性. 在实验性肝纤维化大鼠, IL-10能显著减少干预模型肝纤维化的发生, 降低IL-6, TNF- α , TGF- β 的表达^[38]; IL-10还能减轻大鼠肝纤维模型的纤维化程度; 他通过降低MMP-2, MMP-9表达, 使肝内胶原沉积减少, 从而减少基底膜的降解, 并能降低TIMP-1的表达, 解除对MMPs尤其是MMP-1的抑制而加速胶原蛋白的降解^[39]. IL-10降低肝纤维化大鼠与体外培养的HSC的多种生长因子的表达^[40-41]; 能使体外培养的HSC增加Bax表达, 同时降低Bcl-2的表达, 对肝纤维化具有拮抗作用^[42]. IL-10可通过JAK/STAT通路诱导细胞因子信号阻抑蛋白SOCS基因表达, 阻断炎症性细胞因子信号转导通路, 在急性肝损害时加强其负反馈调节, 减少肝纤维化的发生^[43-44].

2.2.2 INF- γ γ -干扰素(INF- γ)属于干扰素家族, 由激活的CD4⁺、CD8⁺T细胞和NK细胞产生, 其中主要产生INF- γ 的是CD4⁺的Th1细胞, 这些细胞

■创新盘点

HSC的活性受神经、体液、内分泌等多种因素的影响, TGF- β 、PDGF等生长因子具有促进HSC有丝分裂的作用; RAS、NADPH氧化酶等调节血管神经活性, 并与肝脏过氧化损伤有关; INF- γ 、IL-10、SOCS等对炎症有负性调节的作用; HSC的凋亡主要经Fas/FasL途径, 受Bax, Bcl-2, P53等因子的调节.

■应用要点

合理阻断生长因子对HSC的刺激作用,利用抗炎因子减轻肝脏炎症,抑制RAS和NADPH氧化酶等的作用保护肝细胞和减少HSC的激活,是目前肝纤维化治疗的主要方向。

经抗原刺激后,直接使INF- γ 基因转录活化,产生的INF- γ 反过来又促进了Th1增殖,同时抑制Th2。INF- γ 抑制TGF- β_1 及星形细胞的活化和增生,从而减少ECM的合成,抑制肝纤维化。INF- γ 是目前公认的抗病毒和抗纤维化药物,已较广泛的应用于乙肝和丙肝等病毒感染的临床治疗;但INF- γ 用药途径有限,病人依从性差,有待改进。INF- γ 动物体内试验,以AAV为载体介导INF- γ 表达,成功阻止了肝纤维化的进展^[45]。

2.2.3 TNF- α 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是巨噬细胞受炎症或免疫刺激所分泌的一种多功能细胞因子,被认为与NASH的发生密切相关,许多感染(如细菌、病毒、寄生虫等)均可致其分泌增加。分泌过多时可刺激粒细胞和肌成纤维细胞增生,损伤内皮细胞,促进白介素如IL-1生成,导致休克、组织损伤及纤维化等。TNF- α 能激活凝血系统,导致血管、毛细血管内血栓形成,影响肝脏血液循环,加重损害,还可以通过产生内源性丝氨酸类蛋白酶而间接损伤肝细胞。TNF- α 是一种作用很强的促有丝分裂原,可活化细胞外信号调节激酶ERK通路和JNK通路,从而促进HSC产生ECM,导致肝纤维化的形成。TNF- α 刺激HSC表达TIMP-1并抑制其凋亡, KC以自分泌及旁分泌的方式,通过TNF- α /TNFR途径介导NASH模型纤维化的发生^[46]。培养的HSC, TNF- α 能阻止PPAR的反式激活作用^[47]。

2.2.4 SOCS 在TNF- α , IL-1 β 与INF α/β 信号通路的直接相互作用中,至少有3个分子起着非常重要的作用,即SOCS1, SHP2和STAT1。细胞因子信号抑制蛋白(suppressor of the cytokine signaling, SOCS),是JAK/STAT通路的反馈抑制因子,又被称为细胞的“分子刹车”,SOCS1可能通过减轻肝脏炎症反应和纤维化来抑制肝癌形成^[43]。SOCS3作为SOCS家族一员,由氨基端的N区、中间的SH2区和羧基端的SOCS盒3个部分组成。细胞受到生理或环境压力时SOCS3的翻译从第12个氨基酸Met处起始,由于缺失了N端的泛素化位点Lys6,这种蛋白质和缺失了C端的SOCS框一样,泛素化作用减弱,而稳定性则大大增强,对细胞因子信号通路的阻断作用也加强。细胞因子通过JAK/STAT通路诱导SOCS3基因表达,其表达产物又特异性地抑制细胞因子介导的JAK/STAT通路。通过诱导SOCS3过表达,阻止Leptin受体磷酸化途径,能抑制Leptin介导的HSC增殖^[44]。

2.3 影响血管活性的因子

2.3.1 RAS相关因子 肾素-血管紧张素系统(RAS)与肝纤维化密切相关。血管紧张素 II (Ang II)是促纤维生长因子, Ang II能磷酸化MAPK与AKT,从而通过氧化还原反应增加AP-1与DNA结合,刺激DNA合成、HSC细胞迁移、原胶原 α_1 mRNA的表达,分泌TGF- β_1 等炎症因子,促进肝纤维化。Oben *et al*^[48]研究表明, HSC表达肾上腺素能受体AT-1A、儿茶酚氨生物合成酶,释放去甲肾上腺素NE, NE通过RAS发挥作用。多巴胺 β 羟化酶缺乏的缺陷小鼠(Dbh-/-Mice)来源培养的HSC,因不能分泌NE而生长缓慢,若加入外源NE则又恢复生长^[49]。该研究发现其胞内转导途径为G蛋白偶联肾上腺素能受体/促有丝分裂激活酶/磷脂酰肌醇III激酶途径; Dbh-/-Mice肝损伤后HSC的 α -平滑肌肌动蛋白、TGF- β_1 、胶原较对照组显著降低,加入异丙肾上腺素后HSC才进一步被激活。培养的HSC能对SNS神经递质发生应答,刺激HSC增殖并表达胶原; SNS的阻断剂能减低实验性大鼠的纤维化程度^[50-52]。

2.3.2 NADPH氧化酶 吞噬细胞型NADPH氧化酶诱导吞噬细胞产生大量的超氧化物,在机体免疫防御中发挥重要作用。有实验室在血管内皮细胞发现的功能性非吞噬细胞型NADPH氧化酶也能象吞噬细胞型一样产生呼吸爆发,生成大量的超氧化物、氧自由基,但不同的是他在一般的情况下,只产生少量的活性氧族(ROS),只有在如Ang II刺激下才生成大量的超氧化物^[53]。HSC表达非吞噬细胞型NADPH氧化酶的主要成分, Ang II通过结合HSC表面的AT-1受体,使p47^{phox}发生磷酸化,调节NADPH氧化酶的亚基,通过NADPH氧化酶途径,介导活性氧族的形成,增强HSC脂质过氧化, p47^{phox}小鼠与WT相比,对Ang II的反应明显降低,对药物或胆管结扎肝损害后纤维化程度亦减轻; NADPH氧化酶阻断剂能抑制Ang II的相应作用^[54-55]。NADPH氧化酶通过p38MAPK途径在PDGF所致HSC增殖过程发挥作用,抑制NADPH氧化酶可以抑制PDGF-BB的表达,抑制HSC的增殖^[56]。抗氧化治疗能减少血液及局部的氧自由基,对不同原因引起的肝纤维化都可起保护肝细胞的作用,抗氧化剂VitE、西利马林、磷脂酰胆碱、S-腺苷-L蛋氨酸都有抑制HSC激活、保护肝细胞减少其凋亡的作用;破坏NADPH氧化酶,能有效减轻肝纤维化的发生^[57]。

2.3.3 NO NO在机体内的作用取决于组织产生NO的量,少量的NO有利于局部血流灌注的增加,阻止血小板聚集和凝血,能中和急性感染、再灌注损伤和其他炎症时产生的大量氧自由基;而慢性肝病时产生的大量的NO则是有害的,可能有助于癌症的发生.选择性NO合酶的阻滞剂和细胞特异性NO受体将有可能成为肝纤维化治疗的新疗法^[58].

2.4 其他 结缔组织生长因子(CTGF)在肝内主要由HSC分泌,是TGF- β_1 的下游反应元件,其表达程度与肝纤维化程度呈平行相关;SCF能刺激早期干细胞与祖细胞的增殖与定居,人类纤维化肝组织可持续表达SCF;SCF可以刺激HSC、肥大细胞生长,促进纤维化的进展.IL-1 β 通过刺激肝脏炎症反应启动或加速肝纤维化的发展;IL-6也是重要的炎症介质,能刺激HSC增殖,促进肝纤维化的发生.TGF- β 超家族细胞因子激活素A(activin A)在肝脏,能抑制细胞生长,诱导其凋亡,促进间质细胞增殖及细胞外基质分泌.INF- α 也可以通过减轻肝组织炎症和抑制HSC活化、诱导其凋亡减轻肝纤维化的发生.此外,内皮素 I 能通过A型受体强烈的收缩血管,刺激纤维化的发生^[59].

肝纤维化是一个复杂的过程,影响肝纤维化的因素很多,不但与局部的细胞因子有关,还与全身的神经、体液、内分泌因素相关.HSC是肝纤维化过程的中心环节,不同病因引起的肝纤维化有不同的特点,发挥主要作用的因子也有所差别.我们应该利用纤维化相关因子所起的作用,针对不同的病因,阻断其主要的致纤维化途径,采取不同的治疗策略.

3 参考文献

- 1 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275: 2247-2250
- 2 Brito JM, Mermelstein CS, Tempone AJ, Borojevic R. Mast cells can revert dexamethasone-mediated down-regulation of stem cell factor. *Eur J Pharmacol* 2001; 414: 105-112
- 3 Jeong WI, Lee CS, Park SJ, Chung JY, Jeong KS. Kinetics of macrophages, myofibroblasts and mast cells in carbon tetrachloride-induced rat liver cirrhosis. *Anticancer Res* 2002; 22: 869-877
- 4 Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, Vizzutti F, Anania FA, Milani S, Rombouts K, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 42: 1339-1348
- 5 Marra F, Aleffi S, Bertolani C, Petrai I, Vizzutti

- F. Adipokines and liver fibrosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005; 9: 279-284
- 6 Ikejima K, Okumura K, Lang T, Honda H, Abe W, Yamashina S, Enomoto N, Takei Y, Sato N. The role of leptin in progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2005; 33: 151-154
- 7 Tsukamoto H. Adipogenic phenotype of hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 132S-133S
- 8 Toyama T, Nakamura H, Harano Y, Yamauchi N, Morita A, Kirishima T, Minami M, Itoh Y, Okanoue T. PPARalpha ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 697-704
- 9 Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 311-335
- 10 Sato M, Suzuki S, Senoo H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* 2003; 28: 105-112
- 11 Garcia-Fernandez M, Castilla-Cortazar I, Diaz-Sanchez M, Navarro I, Puche JE, Castilla A, Casares AD, Clavijo E, Gonzalez-Baron S. Antioxidant effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in rats with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol* 2005; 5: 7
- 12 Cassiman D, Denef C, Desmet VJ, Roskams T. Human and rat hepatic stellate cells express neurotrophins and neurotrophin receptors. *Hepatology* 2001; 33: 148-158
- 13 Cassiman D, van Pelt J, De Vos R, Van Lommel F, Desmet V, Yap SH, Roskams T. Synaptophysin: A novel marker for human and rat hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 1999; 155: 1831-1839
- 14 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- 15 Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol* 1999; 30: 48-60
- 16 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 17 Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Rugge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 126: 955-963
- 18 Zhang LJ, Wang XZ. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1681-1685
- 19 Wheeler MD, Kono H, Yin M, Nakagami M, Uesugi T, Arteel GE, Gabele E, Rusyn I, Yamashina S, Froh M, Adachi Y, Iimuro Y, Bradford BU, Smutney OM, Connor HD, Mason RP, Goyert SM, Peters JM, Gonzalez FJ, Samulski RJ, Thurman RG. The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1544-1549
- 20 Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ, Bae YS. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol* 2004; 173: 3589-3593
- 21 Knittel T, Kobold D, Saile B, Grundmann A,

■名词解释

- 1 ECM: 细胞外基质,由胶原、蛋白多糖、糖蛋白等构成;大量的细胞外基质特别是胶原在肝窦的沉积,导致了肝纤维化的发生.
- 2 HSC: 肝星状细胞,肝内的间充质细胞,位于血窦与肝细胞间的Disse间隙,有静息和激活两种状态,激活的HSC可分泌大量的细胞外基质,在肝纤维化过程中发挥重要作用.
- 3 肝纤维化相关因子: 与肝纤维化发生、发展及治疗相关的各类因子,主要包括生长因子、炎症相关因子、影响血管活性的因子等.

- Neubauer K, Piscaglia F, Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology* 1999; 117: 1205-1221
- 22 Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C virus core and nonstructural proteins induce fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2004; 126: 529-540
- 23 Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001; 48: 548-557
- 24 Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 123-126
- 25 Nakamura T, Ueno T, Sakamoto M, Sakata R, Torimura T, Hashimoto O, Ueno H, Sata M. Suppression of transforming growth factor-beta results in upregulation of transcription of regeneration factors after chronic liver injury. *J Hepatol* 2004; 41: 974-982
- 26 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, Wang XF, Rippe RA, Brenner DA. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 2001; 34: 89-100
- 27 Komuves LG, Feren A, Jones AL, Fodor E. Expression of epidermal growth factor and its receptor in cirrhotic liver disease. *J Histochem Cytochem* 2000; 48: 821-830
- 28 Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afdhal N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124: 147-159
- 29 Borlak J, Meier T, Halter R, Spanel R, Spanel-Borowski K. Epidermal growth factor-induced hepatocellular carcinoma: gene expression profiles in precursor lesions, early stage and solitary tumours. *Oncogene* 2005; 24: 1809-1819
- 30 Iimuro Y, Fujimoto J. Strategy of gene therapy for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 45-47
- 31 Kim WH, Matsumoto K, Bessho K, Nakamura T. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am J Pathol* 2005; 166: 1017-1028
- 32 Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, Matsumoto K, Nakamura T, Takahashi H, Okamoto E, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999; 5: 226-230
- 33 Campbell JS, Hughes SD, Gilbertson DG, Palmer TE, Holdren MS, Haran AC, Odell MM, Bauer RL, Ren HP, Haugen HS, Yeh MM, Fausto N. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 3389-3394
- 34 Chen YX, Lu CH, Xie WF, Zhang XR, Zhang ZB, Wei LX, Jin YX, Guo YJ. Effects of ribozyme targeting platelet-derived growth factor receptor beta subunit gene on the proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells *in vitro*. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118: 982-988
- 35 Canturk NZ, Canturk Z, Ozden M, Dalcik H, Yardimoglu M, Tulubas F. Protective effect of IGF-1 on experimental liver cirrhosis-induced common bile duct ligation. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 2061-2066
- 36 Mugerza B, Castilla-Cortazar I, Garcia M, Quiroga J, Santidrian S, Prieto J. Antifibrogenic effect *in vivo* of low doses of insulin-like growth factor-I in cirrhotic rats. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1536: 185-195
- 37 Castilla-Cortazar I, Aliaga-Montilla MA, Salvador J, Garcia M, Delgado G, Gonzalez-Baron S, Quiroga J, Prieto J. Insulin-like growth factor-I restores the reduced somatostatinergic tone controlling growth hormone secretion in cirrhotic rats. *Liver* 2001; 21: 405-409
- 38 Zhang LJ, Yu JP, Li D, Huang YH, Chen ZX, Wang XZ. Effects of cytokines on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 77-81
- 39 Zheng WD, Zhang LJ, Shi MN, Chen ZX, Chen YX, Huang YH, Wang XZ. Expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in hepatic stellate cells during rat hepatic fibrosis and its intervention by IL-10. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1753-1758
- 40 Wang XZ, Chen ZX, Zhang LJ, Chen YX, Li D, Chen FL, Huang YH. Expression of insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 1 receptor and its intervention by interleukin-10 in experimental hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1287-1291
- 41 Shi MN, Zheng WD, Zhang LJ, Chen ZX, Wang XZ. Effect of IL-10 on the expression of HSC growth factors in hepatic fibrosis rat. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4788-4793
- 42 Wang XZ, Zhang SJ, Chen YX, Chen ZX, Huang YH, Zhang LJ. Effects of platelet-derived growth factor and interleukin-10 on Fas/Fas-ligand and Bcl-2/Bax mRNA expression in rat hepatic stellate cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2706-2710
- 43 Yoshida T, Ogata H, Kamio M, Joo A, Shiraishi H, Tokunaga Y, Sata M, Nagai H, Yoshimura A. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. *J Exp Med* 2004; 199: 1701-1707
- 44 Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, Anania FA. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J* 2004; 18: 1612-1614
- 45 Chen M, Wang GJ, Diao Y, Xu RA, Xie HT, Li XY, Sun JG. Adeno-associated virus mediated interferon-gamma inhibits the progression of hepatic fibrosis *in vitro* and *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4045-4051
- 46 Tomita K, Tamiya G, Ando S, Ohsumi K, Chiyo T, Mizutani A, Kitamura N, Toda K, Kaneko T, Horie Y, Han JY, Kato S, Shimoda M, Oike Y, Tomizawa M, Makino S, Ohkura T, Saito H, Kumagai N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic

- steatohepatitis in mice. *Gut* 2006; 55: 415-424
- 47 Sung CK, She H, Xiong S, Tsukamoto H. Tumor necrosis factor- α inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity at a posttranslational level in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G722-G729
- 48 Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004; 53: 438-445
- 49 Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Lora JM, Al-Garawi A, Sole M, Colmenero J, Nicolas JM, Jimenez W, Weich N, Gutierrez-Ramos JC, Arroyo V, Rodes J. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology* 2003; 125: 117-125
- 50 Dubuisson L, Desmouliere A, Decourt B, Evade L, Bedin C, Boussarie L, Barrier L, Vidaud M, Rosenbaum J. Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism. *Hepatology* 2002; 35: 325-331
- 51 Oben JA, Yang S, Lin H, Ono M, Diehl AM. Acetylcholine promotes the proliferation and collagen gene expression of myofibroblastic hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 172-177
- 52 Oben JA, Yang S, Lin H, Ono M, Diehl AM. Norepinephrine and neuropeptide Y promote proliferation and collagen gene expression of hepatic myofibroblastic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 302: 685-690
- 53 Wang HD, Johns DG, Xu S, Cohen RA. Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H1697-H1702
- 54 Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1383-1394
- 55 Dechend R, Viedt C, Muller DN, Ugele B, Brandes RP, Wallukat G, Park JK, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V, Dietz R, Haller H, Kreuzer J, Luft FC. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation* 2003; 107: 1632-1639
- 56 Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41: 1272-1281
- 57 Kono H, Rusyn I, Yin M, Gabele E, Yamashina S, Dikalova A, Kadiiska MB, Connor HD, Mason RP, Segal BH, Bradford BU, Holland SM, Thurman RG. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000; 106: 867-872
- 58 Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? *Ann NY Acad Sci* 2002; 962: 275-295
- 59 Cho JJ, Hochoer B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2000; 118: 1169-1178

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

NERD及相关疾病国际研讨会

本刊讯 NERD及相关疾病国际研讨会将于2006-08在三亚举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文和结构式摘要800字, 电脑打印附软盘或E-mail, 2006-06-15截稿。

2 联系方式

北京市鼓楼大街41号中国医学论坛报社 张莉; 邮编: 100009; 电话: 010-64002844; E-mail: NERD@gisummit.com.

TRF2小干扰RNA载体的构建及表达

宁寒冰, 李继昌, 刘志国, 樊代明

■背景资料

端粒及端粒相关因子与DNA损伤的关系是端粒功能研究的一个热点, 而DNA损伤修复抑制也正在成为肿瘤治疗的新的靶点. 我们在前期研究中发现, DNA损伤类化疗药可以诱导胃癌耐药细胞TRF2的过表达, 提示TRF2可能参与胃癌耐药的形成.

宁寒冰, 李继昌, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052

刘志国, 樊代明, 国家肿瘤生物学重点实验室 第四军医大学西京医院全军消化病研究所 陕西省西安市 710032

宁寒冰, 郑州大学医学院博士生, 主要从事消化道肿瘤的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30400016

通讯作者: 刘志国, 710032, 陕西省西安市长乐西路15号, 第四军医大学西京医院消化病研究所. liuzhiguo@fmmu.edu.cn
电话: 029-84775229

收稿日期: 2006-01-03 接受日期: 2006-01-25

Construction and expression of telomeric repeat binding factor 2 small interfering RNA eukaryotic vector

Han-Bing Ning, Ji-Chang Li, Zhi-Guo Liu, Dai-Ming Fan

Han-Bing Ning, Ji-Chang Li, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Zhi-Guo Liu, Dai-Ming Fan, State Key Laboratory of Cancer Biology, Institute of Digestive Diseases, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30400016

Correspondence to: Zhi-Guo Liu, Institute of digestive disease, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 15 Changle West Road, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. liuzhiguo@fmmu.edu.cn

Received: 2006-01-03 Accepted: 2006-01-25

Abstract

AIM: To construct telomeric repeat binding factor 2 (TRF2) small interfering RNA (siRNA) eukaryotic expression vector and evaluate its expression in gastric cancer cells.

METHODS: Two pairs of hairpin siRNA template oligonucleotides for TRF2 based on pSilencer3.1-H1 vector were designed using the manufacturer's web-based tool. These oligonucleotides were annealed and ligated into vector respectively. After confirmation by double enzyme digestion analysis and DNA sequencing, positive recombinant plasmids were transfected into multidrug-resistant gastric cancer cells SGC7901/ADR and SGC7901/VCR respectively. Stable cell lines of G418-resistance were acquired after 2-month selection. The effect of transfection

on cell growth was analyzed by MTT assay. The expression of TRF2 was detected by Western blot after the cells treated with adriamycin (ADR) or etoposide for 6 h.

RESULTS: We constructed two TRF2 siRNA eukaryotic expression vectors successfully and the transfected cells showed significantly suppressed TRF2 expression. The growth of cells were not significantly influenced by transfection ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The TRF2 siRNA eukaryotic expression vectors are successfully constructed and stably expressed in gastric cancer cells.

Key Words: Telomeric repeat binding factor 2; Gastric carcinoma; Small interfering RNA

Ning HB, Li JC, Liu ZG, Fan DM. Construction and expression of telomeric repeat binding factor 2 small interfering RNA eukaryotic vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(11):1044-1047

摘要

目的: 构建TRF2小干扰RNA载体, 观察其在胃癌细胞中的表达.

方法: 根据pSilencer3.1-H1载体要求设计两对干扰RNA, 退火后连接入载体相应位点. 经双酶切及测序鉴定后分别转染多药耐药衍生胃癌细胞SGC7901/ADR和SGC7901/VCR. G418选择培养液培养2 mo选取转染组及对照组细胞克隆. MTT法检测转染对细胞生长增殖速度的影响. 细胞用阿霉素和足叶乙甙处理6 h后Western blot法检测TRF2表达.

结果: 成功构建TRF2小干扰RNA载体, 建立稳定转染细胞株, 转染后TRF2表达明显降低, 对细胞的生长增殖速度无明显影响($P > 0.05$).

结论: 成功构建TRF2小干扰RNA载体及稳定转染细胞株.

关键词: 端粒重复序列结合因子2; 胃癌; 小干扰RNA

宁寒冰, 李继昌, 刘志国, 樊代明. TRF2小干扰RNA载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2006;14(11):1044-1047

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1044.asp>

0 引言

端粒重复序列结合因子2(telomeric repeat binding factor 2, TRF2)能够通过维持端粒末端的T环结构, 防止端粒被DNA损伤修复机制检测为DSBs, 维持端粒的正常结构和功能^[1]. 最新研究发现, 在非端粒部位TRF2也能够抑制ATM依赖的DNA损伤反应, 是通用的DNA损伤修复因子^[2]. 我们在前期研究中发现阿霉素(ADR)和足叶乙甙(etoposide)引起的DNA损伤能使胃癌细胞TRF2的表达增高, 而且在多药耐药衍生胃癌细胞系SGC7901/ADR和SGC7901/VCR中的表达显著高于SGC7901. 为进一步探讨TRF2的功能, 我们构建了TRF2小干扰RNA载体, 并建立了稳定转染细胞株.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基购自GIBCO公司; 抗TRF2抗体购自Upstate公司; etoposide和盐酸阿霉素为Sigma公司产品; pSilencer3.1-H1载体购自Ambion公司; T4 DNA连接酶、*Bam*H I、*Hind* III等限制性内切酶购于TOYOBO公司; 脂质体LipofectamineTM2000为Invitrogen公司产品. 人胃癌细胞系SGC7901, 耐长春新碱(VCR)的胃癌细胞系SGC7901/VCR和耐阿霉素(ADR)的胃癌细胞系SGC7901/ADR均由第四军医大学全军消化病研究所诱导, 保存.

1.2 方法 根据pSilencer3.1-H1载体要求和Ambion公司提供的网上设计软件设计两对小干扰RNA. 具体设计如下: Oligo-1: 5'-gatccgtccaacaccattggattcaagagatccaatggtggtggaggatttttggaa-3'和5'-agcttttccaaaaatcctcaaccaccattggatctctgaatccaatggtggtggaggacg-3'; Oligo-2: 5'-gatccgaacaaagcgcatgacaatattcaagagatattgtcatgcgctgttcttttggaaa-3'和5'-agcttttccaaaaagaacaagcgcatgacaatattcttgaatattgtcatgcgctgttctcg-3'. 将Oligo1, Oligo2根据退火条件90℃退火3 min, 自然冷却得到退火产物. *Bam*H I, *Hind* III双酶切pSilencer3.1-H1载体质粒, 胶回收大片段, 用T4 DNA连接酶连接胶回收片段和退火产物, 16℃连接12 h, 连接产物转化*E.coli* DH5 α 感受态细菌, 氨苄抗性平板过夜培养, 挑取单克隆. *Bam*H I, *Hind* III双酶切后100 g/L SDS-PAGE凝胶电泳产生大小约为60 bp的片段, 表明连接正确. 进一步测序后证实序列完全正确, 质粒分别命名为TRF2-Si1和TRF2-Si2. 根据LipofectamineTM 2000说明书

将TRF2-Si1, TRF2-Si2和空载体质粒分别转染SGC7901/VCR和SGC7901/ADR细胞, 转染48 h后改用G418选择培养液, 培养2 mo选取转染组及对照组细胞克隆, 并用Western blot检测转染细胞TRF2表达情况, 对转染细胞进行鉴定. 分别用20 mg/L etoposide或0.4 mg/L ADR处理各胃癌细胞, 在6 h收获细胞, 三去污裂解液提取细胞总蛋白, Bradford法进行蛋白定量. 120 g/L SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白, 将蛋白条带转移至硝酸纤维膜上, 50 g/L脱脂奶粉封闭后分别与TRF2、 β -actin抗体及HRP标记的相应二抗孵育, ECL进行显色, Western blot检测蛋白表达. 细胞接种于96孔板, 分别在1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 d进行检测. 每孔加入新鲜配制的MTT溶液(5 g/L) 20 μ L, 37℃培养4 h, 每孔加入DMSO 150 μ L, 振荡10 min, 在490 nm波长处测吸光度值, 以时间为横坐标、平均吸光度值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线.

统计学处理 采用SPSS 13.0统计学软件, 进行ANOVA和GLM repeated measures分析.

2 结果

2.1 载体的构建和鉴定 根据pSilencer3.1-H1载体要求设计两对小干扰RNA, 与载体连接构建质粒TRF2-Si1和TRF2-Si2(图1). *Bam*H I, *Hind* III双酶切鉴定, 产生大小约为60 bp的片段(图2泳道2和3), 表明为正确连接的TRF2-Si1和TRF2-Si2. 进一步测序后证实序列完全正确.

2.2 载体的转染和鉴定 将TRF2-Si1, TRF2-Si2和空载体质粒分别转染SGC7901/VCR和SGC7901/ADR细胞, 经G418选择培养后建立稳定转染细胞系. 用Western blot检测etoposide或ADR处理后TRF2表达, 结果显示, 与空载体转染细胞及未转染对照细胞相比, 转染TRF2-Si1或TRF2-Si2后, 细胞TRF2表达明显降低(图3).

2.3 细胞生长增殖速度的检测 采用MTT法测定细胞生长曲线, 结果显示: 与空载体转染细胞及未转染对照细胞相比, 转染细胞的吸光值无明显改变($P>0.05$), 对数生长期均出现在3-8 d(图4). 提示转染对胃癌细胞生长增殖速度无明显影响.

3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 化疗仍为其主要的治疗手段, 但由于存在耐药性和毒副作用, 效果不尽人意. 因此迫切需要寻求新的治疗途径. 大部分的化疗药物通过损伤DNA发挥作用, 而有效的DNA修复是肿瘤细胞对治疗产生

■创新盘点

本研究中构建了TRF2 siRNA载体, 并建立了稳定转染细胞株, 为进一步探索TRF2的功能及其与胃癌耐药的关系提供了材料和条件.

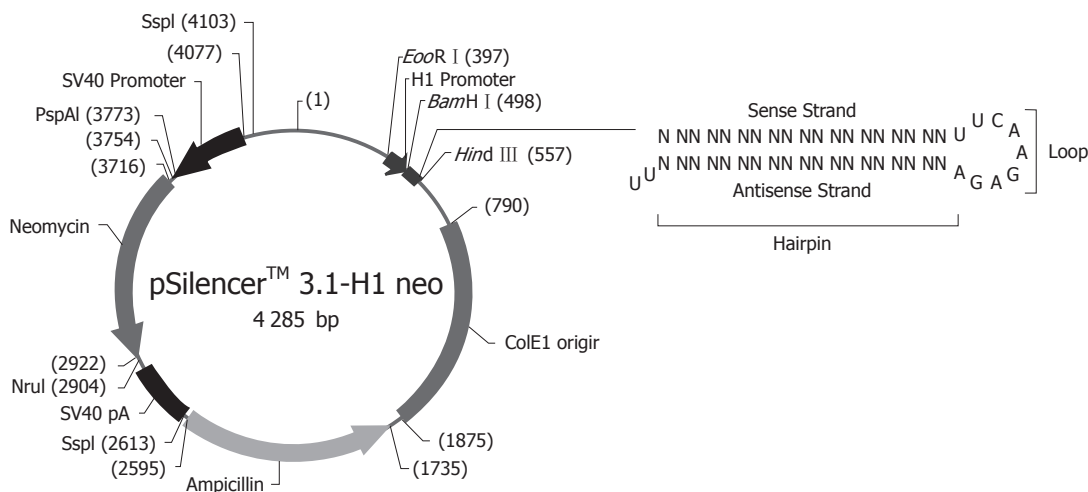
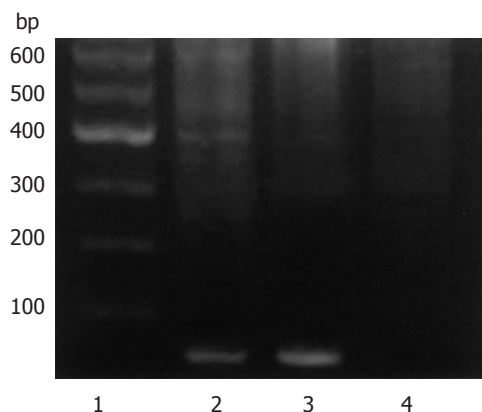


图1 质粒构建模式图.

图2 重组载体TRF2-Si1和TRF2-Si2的酶切鉴定(SDS-PAGE).
1: DNA ladder; 2: TRF2-Si1/BamH I + Hind III; 3: TRF2-Si2/BamH I + Hind III; 4: pSilencer3.1-H1/BamH I + Hind III.

耐受的重要原因^[3]. 因此, 抑制DNA修复是提高DNA损伤类治疗方式效果的有效方法, 最近已有一些抑制DNA修复蛋白的药物如MGMT抑制剂, PARP抑制剂, 甲氧胺等进入临床试验^[4-6], 在与化疗或放疗的联合使用中显示了良好的前景. 不久的将来, DNA损伤修复抑制很可能成为肿瘤常规治疗的一部分^[7].

端粒是位于染色体末端的DNA-蛋白结构, 由TTAGGG重复序列和大量的端粒结合蛋白组成^[8]. 由六个端粒结合蛋白TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1和Rap1组成的复合体起着保护端粒的作用, 被称为是遮蔽蛋白^[9]. 其中端粒重复序列结合因子TRF1和TRF2是两个主要的端粒结合蛋白, 他们通过相互作用来维持端粒的正常结构和功能^[10-11]. TRF2在保护端粒中的作用有以下几个方面: 抑制非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ), 防止不同

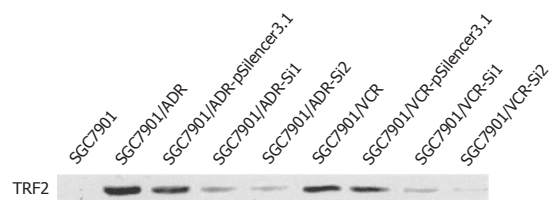


图3 TRF2在胃癌细胞的表达(Western blot).

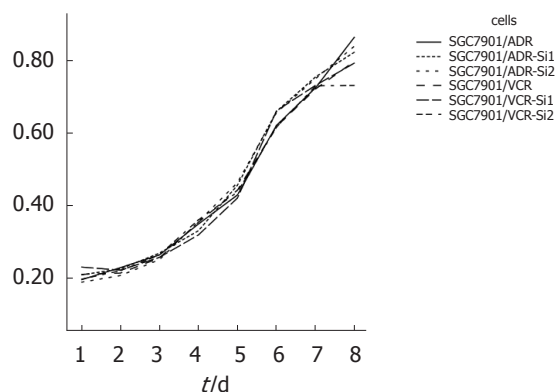


图4 胃癌细胞的生长曲线(MTT法).

染色体末端的融合^[12]; 抑制端粒间的同源重组(homologous recombination, HR)^[13]; 防止t-loop插入部位被认为是Holliday junction而被切除^[14], 导致端粒的缩短. 关于端粒与肿瘤耐药的关系, 以往的研究集中于对端粒酶活性和端粒长度的检测, 但结论仍然存在争议^[15-16]. 最新研究发现化疗药物或射线引起的DNA损伤能使TRF2表达增高, 或同时伴有端粒酶活性增高, 是DNA损伤反应的早期事件^[17]. 而且TRF2在DNA损伤部位的聚集早于其他DNA损伤反应因子ATM、Nbs1等; TRF2的过表达能够抑制ATM依赖的DNA损伤反应^[18-19]. 在端粒, TRF2与DSBs修复的蛋白

如Ku, DNA PKcs, ERCC1/XPC, WRN等有相互作用^[20-22], TRF2还能与ATM直接作用^[23]。因此, TRF2可能是通用的DNA损伤修复因子, 而不仅仅是端粒结合因子^[2]。随着端粒酶和TRF2与DNA损伤修复关系的发现, 关于端粒功能的研究变得更加广泛, 也提示我们端粒可能通过干扰DNA损伤反应参与肿瘤耐药的发生。

ADR和etoposide是临床常用的肿瘤化疗药物, 主要作用机制为抑制DNA拓扑异构酶, 导致DNA双链断裂^[24]。SGC7901/VCR和SGC7901/ADR是由SGC7901诱导的多药耐药衍生胃癌细胞系^[25-26], 我们在前期研究中发现ADR和etoposide能使胃癌细胞TRF2的表达增高, 而且在SGC7901/ADR和SGC7901/VCR中的表达显著高于SGC7901。此次实验, 我们设计了两个TRF2 siRNA真核表达载体, 分别转染SGC7901/ADR和SGC7901/VCR细胞建立稳定转染细胞株。转染后均可明显抑制TRF2表达, 并对细胞的生长无明显影响。本实验为进一步探索TRF2的功能及其与胃癌耐药的关系提供了材料和条件。

4 参考文献

- Houghtaling BR, Cuttonaro L, Chang W, Smith S. A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. *Curr Biol* 2004; 14: 1621-1631
- Wright WE, Shay JW. Telomere-binding factors and general DNA repair. *Nat Genet* 2005; 37: 116-118
- Gatti L, Zunino F. Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol Med* 2005; 111: 127-148
- Tserng KY, Ingalls ST, Boczek EM, Spiro TP, Li X, Majka S, Gerson SL, Willson JK, Hoppel CL. Pharmacokinetics of O6-benzylguanine (NSC637037) and its metabolite, 8-oxo-O6-benzylguanine. *J Clin Pharmacol* 2003; 43: 881-893
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265-7279
- Liu L, Gerson SL. Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. *Curr Opin Investig Drugs* 2004; 5: 623-627
- Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev* 2005; 31: 603-617
- Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem* 2004; 279: 51338-51342
- de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; 19: 2100-2110
- Ye JZ, Hockemeyer D, Krutchinsky AN, Loayza D, Hooper SM, Chait BT, de Lange T. POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev* 2004; 18: 1649-1654
- Court R, Chapman L, Fairall L, Rhodes D. How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *EMBO Rep* 2005; 6: 39-45
- van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998; 92: 401-413
- Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 2004; 119: 355-368
- Steinert S, Shay JW, Wright WE. Modification of subtelomeric DNA. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 4571-4580
- Kuranaga N, Shinomiya N, Mochizuki H. Long-term cultivation of colorectal carcinoma cells with anti-cancer drugs induces drug resistance and telomere elongation: an *in vitro* study. *BMC Cancer* 2001; 1: 10
- Siva AC, Raval-Fernandes S, Stephen AG, LaFemina MJ, Scheper RJ, Kickhoefer VA, Rome LH. Up-regulation of vaults may be necessary but not sufficient for multidrug resistance. *Int J Cancer* 2001; 92: 195-202
- Klapper W, Qian W, Schulte C, Parwaresch R. DNA damage transiently increases TRF2 mRNA expression and telomerase activity. *Leukemia* 2003; 17: 2007-2015
- Bradshaw PS, Stavropoulos DJ, Meyn MS. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet* 2005; 37: 193-197
- Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999; 283: 1321-1325
- Zhu XD, Kuster B, Mann M, Petrini JH, de Lange T. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 2000; 25: 347-352
- Song K, Jung D, Jung Y, Lee SG, Lee I. Interaction of human Ku70 with TRF2. *FEBS Lett* 2000; 481: 81-85
- Opresko PL, von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Bohr VA. Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* 2002; 277: 41110-41119
- Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kastan MB, Petrini JH, de Lange T. The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2004; 2: E240
- Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry* 2000; 65: 95-106
- Shen H, Pan Y, Han Z, Hong L, Liu N, Han S, Yao L, Xie H, Zhaxi C, Shi Y, Fan D. Reversal of multidrug resistance of gastric cancer cells by downregulation of TSG101 with TSG101siRNA. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 561-565
- Du J, Pan Y, Shi Y, Guo C, Jin X, Sun L, Liu N, Qiao T, Fan D. Overexpression and significance of prion protein in gastric cancer and multidrug-resistant gastric carcinoma cell line SGC7901/ADR. *Int J Cancer* 2005; 113: 213-220

电编 张敏 编辑 潘伯荣

宫内缺氧对子代大鼠脂肪肝发病的影响

苏瑞娟, 吕国荣, 王振华, 李伯义, 刘彦英, 何韶铮, 金鹏

■背景资料

流行病学调查发现, 出生时状况不良与个体晚年多种代谢性疾病的发病有关, 故提出假说认为先天性宫内状况不良可能导致基因突变, 从而引发个体晚年多种疾病的发生, 其中包括糖尿病、动脉粥样硬化等。

苏瑞娟, 吕国荣, 王振华, 李伯义, 刘彦英, 何韶铮, 金鹏, 福建医科大学第二附属医院超声科 福建省泉州市
福建省自然科学基金资助课题, No. C0540002
通讯作者: 吕国荣, 362000, 福建省泉州市, 福建医科大学附属第二医院超声科, sulon1015@yahoo.com.cn
电话: 0595-22525702
收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-13

Influence of intrauterine hypoxia on pathogenesis of fatty liver in offspring rats

Rui-Juan Su, Guo-Rong Lv, Zhen-Hua Wang, Bo-Yi Li, Yan-Ying Liu, Shao-Zheng He, Peng Jin

Rui-Juan Su, Guo-Rong Lv, Zhen-Hua Wang, Bo-Yi Li, Yan-Ying Liu, Shao-Zheng He, Peng Jin, Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 36200, Fujian Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province, No. C0540002
Correspondence to: Guo-Rong Lv, Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 36200, Fujian Province, China. sulon1015@yahoo.com.cn
Received: 2006-02-06 Accepted: 2006-02-13

Abstract

AIM: To study the roles of simple fetal hypoxia, or combined with high-fat diet and the second hypoxia, in adiposis hepatica of offspring rats.

METHODS: Rat intrauterine hypoxia models were established, and then their offspring were exposed to high-fat diet or/and second hypoxia. The histogram of hepatic ultrasound was measured by B-ultrasound examination. Pathological observation was performed by HE staining for calculating the number of fatty degenerative hepatic cells in the offspring rat with CMIAS system.

RESULTS: The number of the fatty degenerative cells in liver tissues was significantly different between the intrauterine hypoxia group and controls, the high-fat diet group and controls, as well as between the second hypoxia group and controls ($F = 13.348, 45.45, 18.541$, respectively; all $P < 0.05$). Moreover, there was an interactive effect between intrauterine hypoxia and high-fat

diet, or intrauterine hypoxia and high-fat diet (F values for the number of the fatty degenerative cells were 5.723 and 5.933, respectively, both $P < 0.05$). In addition, a positive correlation ($r = 0.810$, $P < 0.05$) was observed between the number of fatty degenerative cells in the offspring liver tissues and the B-ultrasound gray scale value.

CONCLUSION: Intrauterine hypoxia may increase the risk of fatty liver in the offspring of rats exposed to long-term high-fat diet.

Key Words: Intrauterine hypoxia; Fatty liver; Ultrasound histogram

Su RJ, Lv GR, Wang ZH, Li BY, Liu YY, He SZ, Jin P. Influence of intrauterine hypoxia on pathogenesis of fatty liver in offspring rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(11):1048-1051

摘要

目的: 探讨宫内缺氧及出生后联合高脂饮食和追加缺氧对子代大鼠脂肪肝发病的影响。

方法: 建立大鼠宫内缺氧模型, 并对子代大鼠施加高脂饮食和追加缺氧干预, 测量子代大鼠肝脏超声灰阶值, 处死后取肝脏组织, 行常规HE染色, 用CMIAS多功能真彩色病理图像分析系统行半自动定量分析肝脏脂肪变性细胞数目。

结果: 宫内缺氧、高脂饮食和追加缺氧的主效应(在脂肪变性细胞数 F 值分别为: 13.348, 45.45, 18.541; 均 $P < 0.05$) 在脂肪肝发病中均有促进作用; 在脂肪肝的发病中, 宫内缺氧与高脂饮食、高脂饮食与追加缺氧间的交互作用(在脂肪变性细胞数 F 值分别为: 5.723, 5.933; 均 $P < 0.05$) 存在; 超声灰阶均值与脂肪变性细胞数间呈正相关($r = 0.810$, $P < 0.05$)。

结论: 宫内缺氧可增加子代大鼠对高脂饮食所致的脂肪肝的敏感性。

关键词: 宫内缺氧; 脂肪肝; 超声直方图

苏瑞娟, 吕国荣, 王振华, 李伯义, 刘彦英, 何韶铮, 金鹏. 宫

内缺氧对子代大鼠脂肪肝发病的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1048-1051

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1048.asp>

0 引言

成人慢性疾病, 包括心血管疾病、代谢性疾病等的发生, 与胎儿时期在子宫内营养缺乏、缺氧、胎盘功能不良等因素密切相关, 流行病学调查亦显示出二者间较高的相关性^[1-3], 基于此, Barker *et al*提出了胎儿期宫内不良环境可引起成人慢性疾病的假说^[3]. 脂肪肝作为代谢性疾病的一种, 正日益引起重视, 有研究表明, 肝脏脂肪堆积和胰岛素抵抗在非酒精性脂肪肝的发病中占有重要地位, Samuel *et al*^[4]发现, 高脂饮食引起的脂肪堆积可致胰岛素抵抗的发生, 从而引起脂肪肝的发生. 鉴于上述研究结果, 我们建立大鼠宫内缺氧模型, 并给予高脂饮食及追加缺氧作为暴露因素, 旨在从动物实验的角度探讨Barker假说, 并考察宫内缺氧在非酒精性脂肪肝发病中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 孕龄7 d的SD大鼠20只(大鼠年龄10月龄, 体质量300-350 g), 75 cm×65 cm×35 cm的缺氧箱一个, S-450型氧气检测报警仪一台(IST-AIM公司生产). 压缩氧气(浓度>990 mL/L), 压缩氮气(浓度>990 mL/L)(由泉州制氧厂提供), 碱石灰. 高脂饲料(成分: 基础饲料92.3 g/kg, 胆固醇2 g/kg, 猪油5 g/kg, 胆酸钠0.5 g/kg, 丙基硫氧嘧啶0.2 g/kg). AlokaSSD-1700彩色超声诊断仪. 3.5 MHz探头. 100 g/L Na₂S溶液.

1.2 方法 孕龄7 d的SD大鼠置入缺氧箱中, 箱内氧气浓度控制在100±10 mL/L之间, 每日缺氧8 h, 孕15 d后改为每日缺氧4 h, 直至分娩. 同时将相同孕龄SD大鼠20只作为对照组, 置入相同玻璃箱, 持续通入空气, 时间同缺氧组. 将出生子鼠按三因素两水平析因设计、完全随机原则分为8组(表1): 正常对照组, 宫内缺氧组, 高脂饮食组, 追加缺氧组, 宫内缺氧+高脂饮食组, 宫内缺氧+追加缺氧组, 宫内缺氧+高脂饮食+追加缺氧组, 高脂饮食+追加缺氧组, 每组6只(雌雄各3只). 普通饮食喂养子代大鼠至12月龄, 按实验设计给予高脂饲料喂养至15月龄; 12月龄子代大鼠给予追加缺氧, 方法同前, 每日缺氧8 h, 共4 wk.

将子代大鼠用100 g/L Na₂S溶液脱毛后,

表 1 三因素两水平实验设计表(只)

		追加缺氧 ¹	
		+	-
宫内缺氧	高脂饮食	6	6
	普通饮食	6	6
无宫内缺氧	高脂饮食	6	6
	普通饮食	6	6

¹+: 追加缺氧; -: 无追加缺氧.

AlokaSSD-1700彩色超声诊断仪, 探头频率3.5 MHz, 沿右肋缘下行肝脏扫描, 固定增益条件(G80, R10)和放大倍数取右肾刚刚消失、肝裂出现断面冻结, 调出HIST-B功能中自动取样测量菜单, 取样面积固定为0.5 cm×0.5 cm, 于距皮肤约0.8 cm处, 肝裂上、下、旁分别取样, 记录三处的灰阶平均值. 然后将上述子代大鼠处死, 取肝脏的检测部位组织, 常规固定、包埋制片及HE染色, 使用CMIAS多功能真彩色病理图像分析系统(半自动定量分析)计算鼠肝组织单位视野(系统统一设定)下脂肪变性细胞数目.

统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件包对数据进行分析, 用完全随机分组三因素两水平析因设计, 并对各因素的主效应及交互作用行方差分析, 采用线性相关分析超声灰阶均值与脂肪变性细胞数之间的关系. $P<0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结果

2.1 肝组织学表现 常规HE染色, 空白对照组肝小叶轮廓清晰, 肝细胞排列整齐, 胞质丰富、均匀淡染, 肝小叶单位(CMIAS病理图像分析系统统一设定)视野内未见明显脂肪变性细胞(图1A); 单纯宫内缺氧组可见散在脂肪变性细胞, 固定单位视野内一般小于10个(图1B), 且程度较轻. 宫内缺氧+高脂饮食组肝细胞体积变大, 胞质空泡状(脂滴被溶解), 胞核受挤压偏向一侧(图1C); 宫内缺氧+高脂饮食+追加缺氧组病变严重, 一肝小叶内几乎所有肝细胞均受累(图1D). 单纯追加缺氧组脂肪变性不明显, 余组肝脏细胞脂肪变性程度介于上述病变程度之间.

2.2 肝脏脂肪变性细胞计数统计分析结果 宫内缺氧与无宫内缺氧之间、高脂饮食与无高脂饮食之间、追加缺氧与无追加缺氧之间, 子代大鼠肝组织脂肪变性细胞数均有显著差异(图2); 宫内缺氧与高脂饮食之间、高脂饮食与追加缺氧之间、追加缺氧与宫内缺氧之间存在交互作用, 宫内缺氧与追加缺氧之间,

■创新盘点

本实验建立哺乳动物SD大鼠的宫内缺氧模型, 并将子鼠喂养至中老年, 同时暴露于相关危险因素[高脂饮食和(或)追加缺氧], 观察宫内缺氧对脂类代谢病之一——脂肪肝的影响.

■应用要点

探讨宫内缺氧对成年个体脂肪肝发病的影响,为脂肪肝发病机制的研究提供新的方向,并可为重新认识宫内缺氧的危害提供依据,提高对胎儿宫内缺氧的重视,通过改善宫内氧供避免或降低宫内缺氧对个体的不良影响。

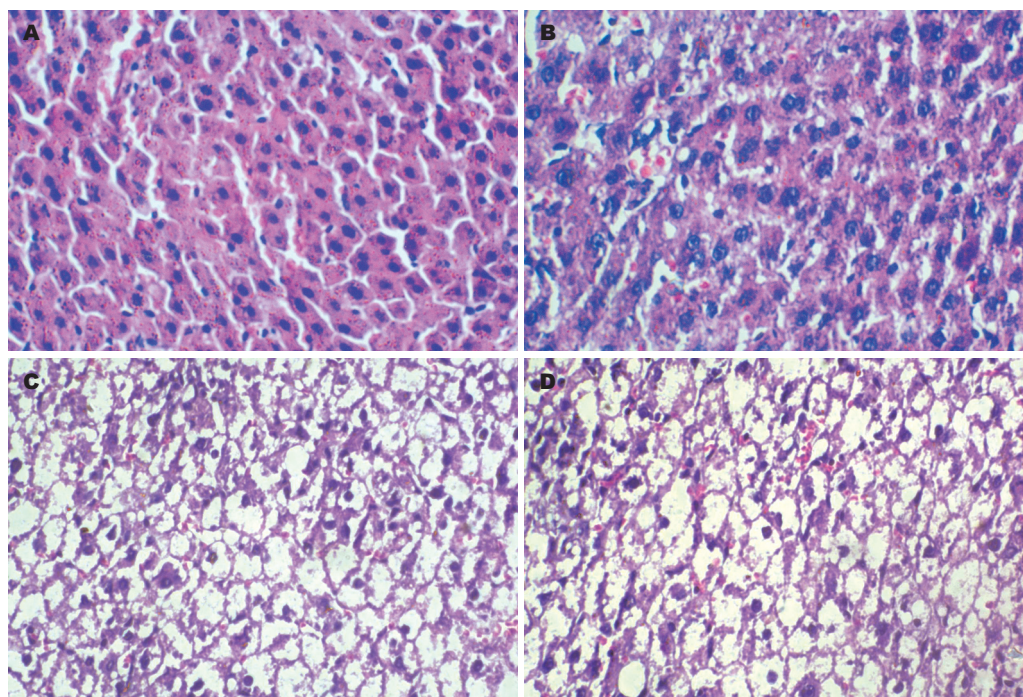


图1 大鼠肝脏组织切片 (HE × 400). A: 单纯无宫内缺氧组; B: 单纯宫内缺氧组; C: 宫内缺氧+高脂饮食组; D: 宫内缺氧+高脂饮食+再缺氧组。

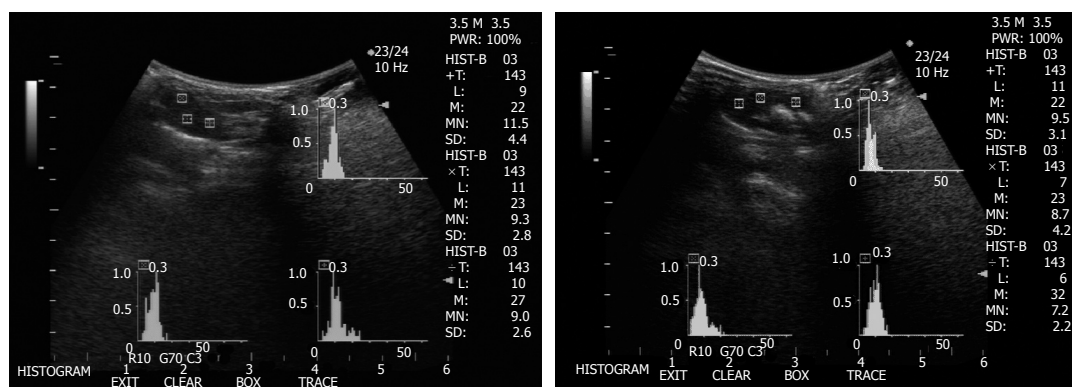


图2 子代大鼠肝脏直方图的测量。

宫内缺氧、高脂饮食及追加缺氧三者之间尚不能认为有交互作用(表2)。

2.3 不同干预因素下子代大鼠肝脏灰阶均值统计分析结果 宫内缺氧与无宫内缺氧之间、高脂饮食与无高脂饮食之间,子代大鼠肝脏灰阶均值均有显著差异(图2); 宫内缺氧与高脂饮食之间、高脂饮食与追加缺氧之间存在交互作用; 宫内缺氧与追加缺氧之间, 宫内缺氧、高脂饮食及追加缺氧三者之间尚不能认为有交互作用(表2)。超声灰阶均值与子代大鼠肝脏脂肪变性细胞数间呈正相关($r = 0.810, P < 0.01$, 图3)。

3 讨论

流行病学调查表明^[1-3], 宫内供氧状况不佳的低

体重儿或头身比例失衡(瘦或矮)新生儿与多种成人慢性疾病的发病间存在相关性, 如冠心病、糖尿病、高脂血症等。本实验中, 我们通过组织病理学、半自动细胞计数、超声灰阶均值等三个角度观察到, 宫内缺氧组子代大鼠肝脏中脂肪变性细胞数目多于同条件下的非宫内缺氧组, 其差异有统计学意义($F = 13.348, P < 0.05$)。可能原因是宫内缺氧引起某些基因表达的改变, 这一过程由低氧诱导因子-1(HIF-1)介导^[5], HIF-1的目的基因主要包括调节能量代谢、血管增生等功能的相关基因, 这些基因受损后可致能量代谢功能异常, 如胰岛素抵抗等, 而胰岛素抵抗正是非酒精性脂肪肝发生的重要因素之一^[6]。据文献报道, 高脂饮食可引起肝脏脂肪

表 2 各组子代大鼠肝脏脂肪变性细胞数目及灰阶均值

干预因素	肝脏脂肪变性细胞数		肝脏灰阶均值	
	F值	P值	F值	P值
宫内缺氧	13.348	<0.05	25.081	<0.05
追加缺氧	18.541	<0.05	3.813	>0.05
高脂饮食	45.45	<0.05	39.586	<0.05
宫内缺氧+高脂饮食	5.723	<0.05	5.272	<0.05
宫内缺氧+追加缺氧	1.591	>0.05	0.055	>0.05
高脂饮食+追加缺氧	5.933	<0.05	7.752	<0.05
宫内缺氧+高脂饮食+追加缺氧	6.884	>0.05	1.297	>0.05

■同行评价

该研究目的明确, 实验合理, 研究结果对于阐明宫内缺氧与脂肪肝发生的关系有参考价值. 统计学分析方法应用适当, 结果可信, 图片质量较好. 文章条理较清晰.

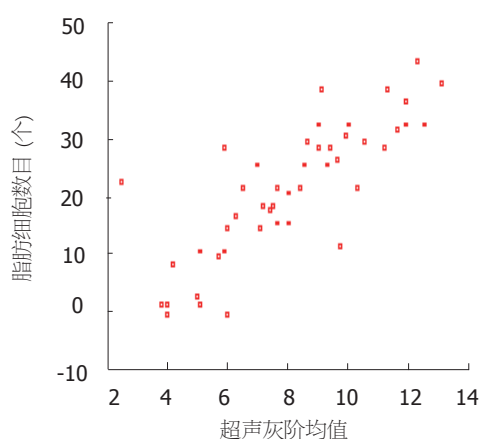


图 3 超声直方图均值与脂肪变性细胞数呈正相关.

堆积, 这种堆积削弱胰岛素受体底物-1(insulin receptor substrate-1, IRS-1)和胰岛素受体底物-2(IRS-2)的酪氨酸磷酸化作用, 从而抑制胰岛素的活性, 这一过程与PKC- ϵ 和JNK-1活性受抑有关^[3]. 此二者可影响IRS-1及IRS-2酪氨酸磷酸化过程并减弱胰岛素促进肝糖原合酶, 将血浆中葡萄糖转化为肝糖原的活性, 导致胰岛素抵抗的发生^[7]. 当宫内缺氧和高脂饮食二者相加时, 作用协同, 将更加明显. 本实验中, 宫内缺氧与高脂饮食的交互作用在脂肪肝的发生中有显著性意义($F = 5.723$, $P < 0.05$), 从动物实验的角度证实了上述观点.

宫内缺氧与追加缺氧在脂肪肝的发生中未见明显作用($F = 1.591$, $P > 0.05$), 说明: 高脂饮食是脂肪肝发生的一个重要条件; 单纯的宫内缺氧并不一定引起脂肪肝的发生, 可能只是促发了基础基因的改变. 当宫内缺氧子代成鼠暴露于高脂饮食下时, 宫内缺氧的作用更加凸现出来, 宫内缺氧与高脂饮食间的交互作用表现为($F = 5.723$, $P < 0.05$). Barker鉴于流行病学显示出胎儿期宫内营养不良或氧供不佳与个体晚年疾病

的发生存在相关性, 提出了Barker假说, 本结果从动物实验角度给其提供了新的佐证. 另外, 通过超声直方图测量灰阶均值, 并与病理观察指标肝脏脂肪变性细胞数目做相关分析, 可以看出, 超声灰阶均值与脂肪变性细胞间有较好的相关性($r = 0.810$, $P < 0.01$), 表明超声直方图测量灰阶均值作为超声诊断脂肪肝的一种量化手段, 可以弥补既往超声诊断依靠经验, 缺乏客观标准的不足, 与病理学又有较好的一致性, 有一定的临床价值.

总之, 本实验的结果为研究多种老年性疾病的发病机制提供了新的启示和方向, 同时也引起临床工作者对胎儿时期宫内营养及氧供等状态的进一步重视, 利于优生优育工作的开展.

4 参考文献

- 1 Ruijtenbeek K, Kessels CG, Janssen BJ, Bitsch NJ, Fazzi GE, Janssen GM, De Mey J, Blanco CE. Chronic moderate hypoxia during in ovo development alters arterial reactivity in chickens. *Pflugers Arch* 2003; 447: 158-167
- 2 Ruijtenbeek K, Kessels LC, De Mey JG, Blanco CE. Chronic moderate hypoxia and protein malnutrition both induce growth retardation, but have distinct effects on arterial endothelium-dependent reactivity in the chicken embryo. *Pediatr Res* 2003; 53: 573-579
- 3 Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1344S-1352S
- 4 Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 32345-32353
- 5 Bohr I. Hypercholesterolemic diet applied to rat dams protects their offspring against cognitive deficits. Simulated neonatal anoxia model. *Physiol Behav* 2004; 82: 703-711
- 6 王广华. 非酒精性脂肪肝发病机制研究进展. *中国康复理论与实践* 2004; 10: 243-244
- 7 丁效蕙, 赵景民. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制及治疗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 371-375

电编 张敏 编辑 潘伯荣

流体力学法乙型肝炎病毒感染动物模型的建立

应若素, 范学工, 李宁, 朱才, 刘洪波

■背景资料

抗HBV治疗仍是目前难题之一。HBV宿主范围狭窄, 且有明显嗜肝性, 建立合适的HBV动物模型非常困难。目前缺乏理想的HBV模型是限制抗HBV药物发展的主要障碍之一。

应若素, 范学工, 李宁, 朱才, 刘洪波, 中南大学湘雅医院感染病科 湖南省长沙市 410008

应若素, 2000年苏州大学医学院学士, 2003年中南大学湘雅医学院硕士, 现为中南大学湘雅医院在读博士, 主要从事病毒性肝炎的研究。

湖南省科技厅科技计划重点资助项目, No. 05SK2001

通讯作者: 范学工, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院感染病科。xgfan@hotmail.com

电话: 0731-4327392 传真: 0731-4327332

收稿日期: 2006-02-21 接受日期: 2006-03-11

Development of a hepatitis B virus infection animal model by hydrodynamics

Ruo-Su Ying, Xue-Gong Fan, Ning Li, Cai Zhu, Hong-Bo Liu

Ruo-Su Ying, Xue-Gong Fan, Ning Li, Cai Zhu, Hong-Bo Liu, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by the Research Foundation of Science and Technology of Hunan Province, No. 05SK2001

Correspondence to: Dr. Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, 87 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. xgfan@hotmail.com

Received: 2006-02-21 Accepted: 2006-03-11

Abstract

AIM: To develop a simple, convenient, efficient and stable animal model of hepatitis B virus (HBV) infection, and observe the dynamic changes of viral replication as well as expression in the model.

METHODS: pcDNA3.1-HBV was delivered into BALB/c mice using the hydrodynamic tail vein injection method. In a week, the levels of HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBe, and anti-HBc were determined with time-resolved immunofluorometric assay (IFMA) kit, and the titers of HBV DNA were analyzed by fluorogenic quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). In addition, viral specific proteins (HBsAg and HBcAg) in the liver were assayed by immunohistochemical staining.

RESULTS: A mouse model of acute HBV infec-

tion was developed successfully. HBsAg expression reached the peak on day 1, and dropped gradually. The level of HBeAg was low, and the level of anti-HBc, anti-HBe, and anti-HBs were first detected on day 4, 5 and 7, respectively. The titers of HBV DNA also peaked on day 1 and declined thereafter. HBsAg was positively scattered in the cytoplasm of hepatocytes, and HBcAg was mainly positively expressed in the cytoplasm of hepatocytes, too.

CONCLUSION: This is a novel and effective animal model of HBV infection, in which HBV can replicate and express stably.

Key Words: Hydrodynamics; Hepatitis B virus; Animal model

Ying RS, Fan XG, Li N, Zhu C, Liu HB. Development of a Hepatitis B virus infection animal model by hydrodynamics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(11):1052-1057

摘要

目的: 建立一种简便、有效、稳定的乙型肝炎病毒(HBV)感染的动物模型, 观察该模型动物体内不同时间点各种HBV标志物的表达情况。

方法: 以流体力学法尾静脉注射BALB/c小鼠pcDNA3.1-HBV, 1 wk内检测各种HBV标志物, 时间分辨免疫荧光分析法(IFMA)检测血清中HBsAg, HBeAg, 抗HBs, 抗HBe, 抗HBc, 荧光定量PCR法(FQ-PCR)检测血清HBV DNA, 免疫组织化学法检测肝组织HBsAg和HBcAg。

结果: 成功建立一种急性HBV感染动物模型, 第1天血清中HBsAg表达达高峰, 后逐渐降低, HBeAg表达量少, 分别在第4、5、7天检测到抗HBc, 抗HBe, 抗HBs, d1 HBV DNA滴度亦达高峰, 后渐下降, 免疫组织化学示HBsAg呈胞质内弥漫性分布, HBcAg亦主要为胞质型分布。

结论: 以流体力学法建立的HBV模型是一

种新型有效的HBV感染动物模型, 能稳定较高水平表达大部分HBV标志物.

关键词: 流体动力学; 乙型肝炎病毒; 动物模型

应若素, 范学工, 李宁, 朱才, 刘洪波. 流体动力学法乙型肝炎病毒感染动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1052-1057
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1052.asp>

0 引言

据统计, 全球有3-3.5亿人感染乙型肝炎病毒(HBV), 每年约有100万人死于乙型肝炎及其并发症, 而我国则高达9.8%的人为HBV的慢性感染者. HBV的长期存在, 可以导致肝细胞持续损害和肝纤维化, 甚至发展为肝硬化、肝癌^[1]. 抗HBV治疗, 阻断肝细胞内肝炎病毒的复制和表达, 仍是目前难题之一. HBV宿主范围狭窄, 且有明显嗜肝性, 建立合适的HBV动物模型非常困难. 目前缺乏理想的HBV模型是限制抗HBV药物发展的主要障碍之一. 我们拟建立一种简便有效HBV感染的动物模型, 观察该模型HBV标志物的表达情况.

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c小鼠, ♀, 6-7 wk, 18-22 g, 购自中国科学院实验动物中心, 在中南大学湘雅医学院实验动物学部清洁级环境中饲养. 含1.3倍HBV全基因组(ayw亚型)真核表达质粒pcDNA3.1-HBV由重庆医科大学病毒性肝炎研究所黄爱龙教授惠赠. HBsAg, HBeAg, 抗HBs, 抗HBe, 抗HBc定量检测试剂盒(苏州新波生物技术有限公司); HBV DNA定量检测试剂盒(上海申友生物技术有限责任公司); 一抗兔抗HBs(英国Oxford公司), 一抗兔抗HBc(武汉博士德公司), PV-6001二步法免疫组化检测试剂盒(二抗山羊抗兔IgG抗体-HRP多聚体, 北京中杉金桥生物技术有限公司).

1.2 方法 采用流体动力学方法^[2-3]. pcDNA3.1-HBV 60 μg溶于1.8 mL林格注射液(147 mmol/L NaCl, 4 mmol/L KCl, 1.13 mmol/L CaCl₂)中, 经45 mm头皮注射针尾静脉4 s内注射完毕, 保持稳定速度注射. 连续观察7 d, 每个时间点5只小鼠, 眼眶后静脉丛采血, 离心分离血清; 肝组织立即40 g/L中性甲醛固定. 同时观察仅注射1.8 mL林格注射液小鼠, 1, 3, 7 d取血分离血清, 肝组织固定. 血清中HBsAg, HBeAg, 抗HBs, 抗

HBe, 抗HBc的检测利用时间分辨免疫荧光分析方法(IFMA), 具体方法见说明书. 检测仪器为时间分辨免疫荧光测定仪(美国WALLAC公司). HBV DNA的检测采用荧光定量PCR法(FQ-PCR). 血清中ALT和TBIL的检测采用日本全自动生化分析仪HITACHI7170A. 肝组织HBsAg和HBcAg的检测采用二步法免疫组织化学方法并进行DAB染色, 苏木素复染, 兔抗HBs以1:200稀释, 兔抗HBc以1:40稀释, 具体方法见说明书. 用光镜检测肝组织中HBsAg和HBcAg, 每只动物取4块肝组织, 每块肝组织观察5个视野, 每个视野计数100个细胞中HBsAg和HBcAg阳性细胞数.

统计学处理 采用SPSS 12.0统计分析软件. 所有数据结果用mean±SD表示. ALT和TBIL的测定结果采用 t 检验.

2 结果

全部小鼠予流体动力学法注射后, 无1例发生死亡, 1只小鼠发生呼吸困难, 予直立数分钟后缓解. 所有小鼠大剂量溶液注射后, 活动减少, 数十分钟渐活动如常. 与正常对照组比较, 仅注射大剂量林格液后, 第1天ALT明显升高, 肝细胞功能受到损伤, 第3天ALT轻度升高, 肝细胞功能有所恢复, 至第7天完全恢复正常; 注射HBV质粒的小鼠, 第1天和第3天变化同单纯注射林格液组, 而第7天ALT仍高于正常, 表明此时HBV使肝细胞功能受损, 而之前则由注射的大剂量溶液引起. 所有注射小鼠的TBIL一直保持正常(表1).

2.1 血清HBV标志物 HBsAg在第1天表达达高峰, 为 $108.9 \pm 11.8 \mu\text{g/L}$, 后逐渐降低至第7天为0. HBeAg表达量少甚至为0. 分别在第4天, 第5天, 第7天检测到抗HBc, 抗HBe和抗HBs, 抗HBc和抗HBe分别在第5天和第6天达高峰(图1, 表2). 血清HBV DNA滴度第1天亦达高峰, 为 $7.36 \times 10^7 \pm 2.55 \times 10^7$ copies/L, d2降低, 第3天较d2稍高, 以后逐渐下降, 至第7天为0(图2).

2.2 肝组织HBsAg和HBcAg BALB/c小鼠注射质粒第1天, 第3天, 第7天, 均有HBsAg和HBcAg阳性细胞出现. HBsAg第1天表达最强, 呈胞质内弥漫性分布; HBcAg亦主要为胞质型分布(图3-4). 仅注射林格注射液小鼠第1天肝组织疏松, 肝细胞肿胀、空泡变性, 第3天肝组织开始修复, 出现一些再生肝细胞, 细胞核大而染色较深, 有的有双核, 至第7天肝组织基本复常; 注射HBV质粒小鼠肝组织第1天及第3天和上述小鼠类似, 而第

■研究前沿

研究者试图寻找合适的人HBV感染的小动物模型. 小干扰RNA抗HBV的作用被越来越多的学者所重视, 但由于HBV动物模型受到限制, 其研究多限于细胞实验研究. 国外已有学者采用流体动力学方法建立HBV感染动物模型, 研究小干扰RNA在此模型中的抗HBV作用.

■创新盘点

尝试采用流体动力学法仅注射HBV质粒(国外学者同时注射转座子质粒)即能有效、稳定地表达大部分HBV标志物。

表 1 小鼠血清中ALT和TBIL的结果 (mean \pm SD, $n = 5$)

分组	ALT (nkat/L)			TBIL (μ mol/L)		
	d 1	d 3	d 7	d 1	d 3	d 7
正常对照组		488 \pm 105			2.08 \pm 0.54	
林格液组	7992 \pm 320 ^a	877 \pm 113 ^a	470 \pm 85	2.04 \pm 0.49	1.99 \pm 0.49	1.99 \pm 0.33
HBV质粒组	7975 \pm 300 ^a	872 \pm 103 ^a	770 \pm 52 ^{ac}	1.98 \pm 0.49	1.95 \pm 0.34	2.00 \pm 0.28

^a $P < 0.05$ vs 正常对照组; ^c $P < 0.05$ vs 林格液组。

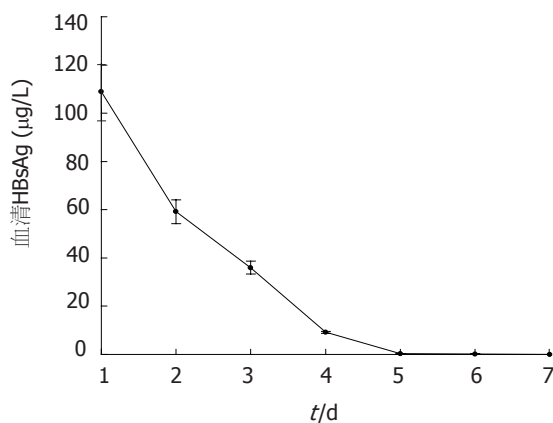
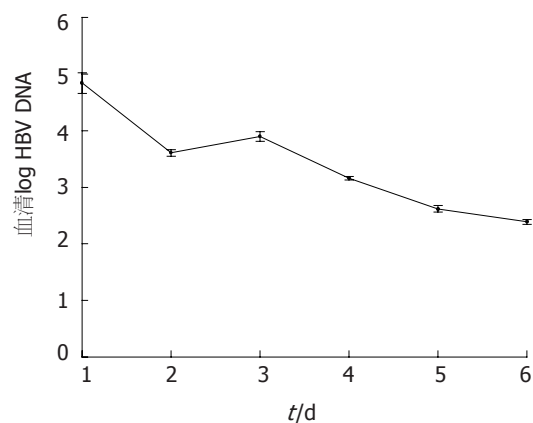
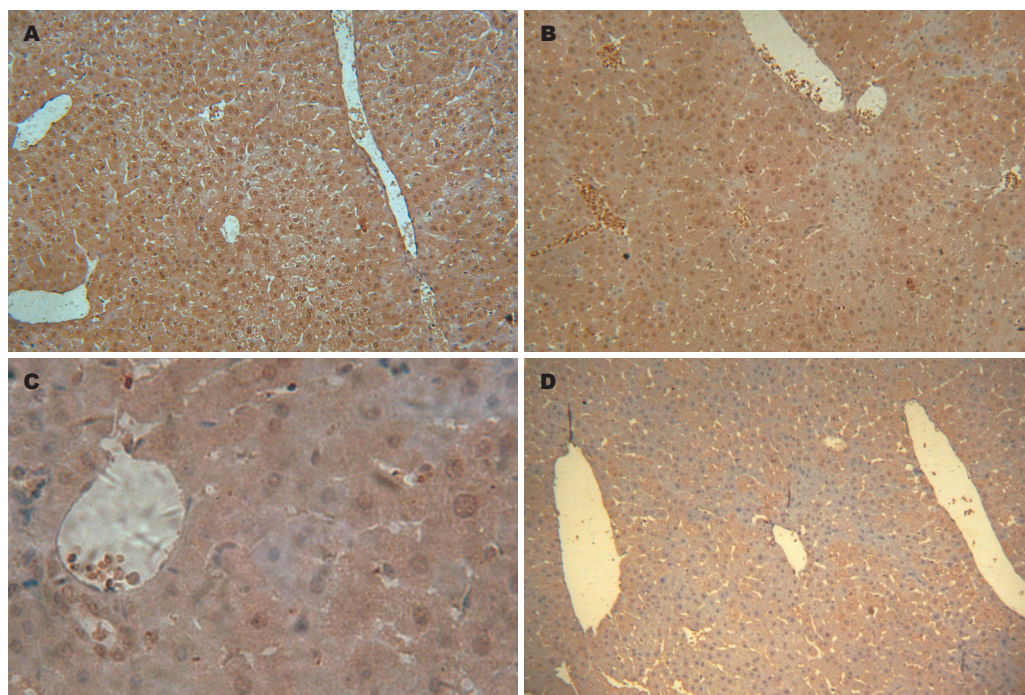
图 1 注射HBV质粒小鼠血清HBsAg的检测结果 ($n = 5$).图 2 注射HBV质粒小鼠血清HBV DNA的检测结果 ($n = 5$).

图 3 注射HBV质粒小鼠肝组织HBsAg分布情况 (DAB染色). A: 第1天(×100); B: 第3天(×100); C: 第3天(×400); D: 第7天(×100).

7天出现炎性细胞浸润(图5箭头所示).

3 讨论

在人HBV动物模型中, HBV感染黑猩猩模型是很成功的^[4], 亦得到公认. 但黑猩猩数量有限、

来源困难、价格昂贵, 因此难以推广, 有必要寻找合适的人HBV感染的小动物模型. 而目前应用较多的人HBV转基因小鼠模型^[5-10], 与其他已有的动物模型相比具有遗传背景清楚, 相对繁殖周期短, 对HBV单个或多个基因区的整合

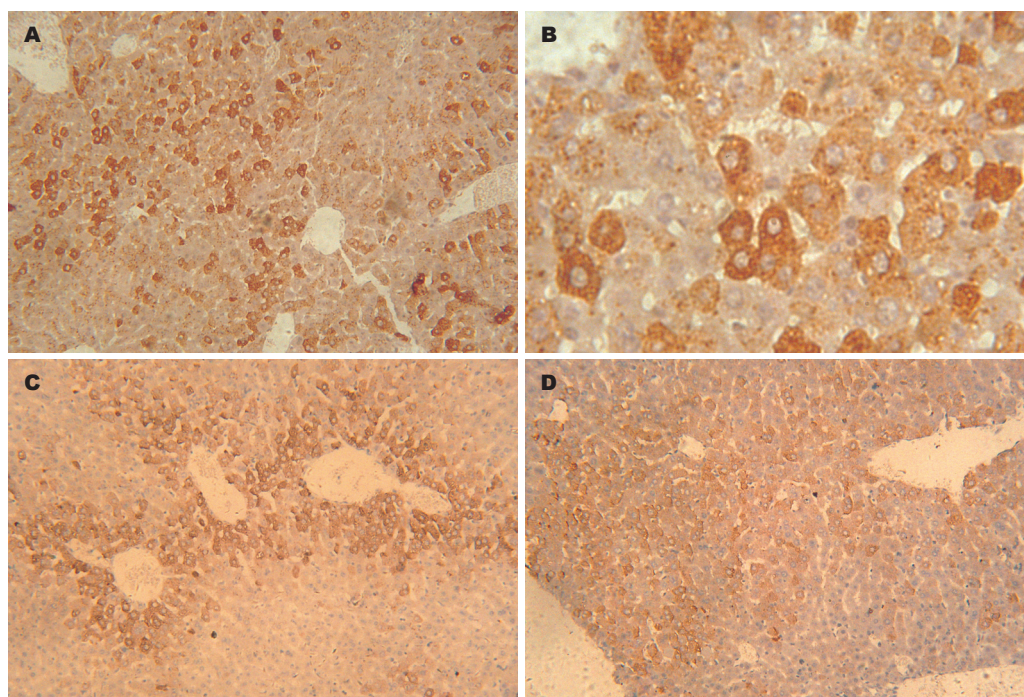


图 4 注射HBV质粒小鼠肝组织HBcAg分布情况 (DAB染色). A: 第1天($\times 100$); B: 第1天($\times 400$); C: 第3天($\times 100$); D: 第7天($\times 100$).

■应用要点

该模型的优点是: 方法简单易行, 各种乙肝标志物表达产量均较高; 该模型HBV具有肝特异性; 该模型的许多特点类似于人体自然感染HBV的过程, 因而对于深入研究人体对HBV的免疫反应有重要帮助. 但该模型亦存在不足, 他是急性HBV感染的动物模型, 不能用来研究慢性HBV感染者, 或许可采用使动物暂时免疫抑制等方法, 诱导慢性或持续性HBV携带状态.

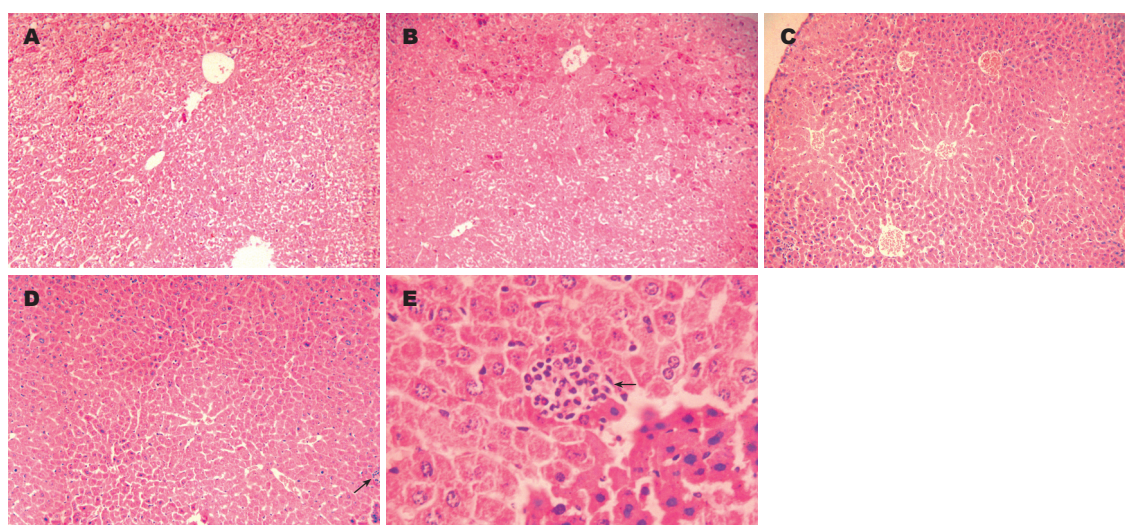


图 5 注射HBV质粒小鼠肝组织病理改变 (HE染色). A: 注射林格液第1天($\times 100$); B: 注射林格液第3天($\times 100$); C: 注射林格液第7天($\times 100$); D: 注射HBV质粒第7天($\times 100$); E: 注射HBV质粒第7天($\times 400$).

表 2 注射HBV质粒小鼠抗体的检测结果 (mean \pm SD, $n = 5$)

抗体	d 4	d 5	d 6	d 7
抗HBc (kNCU/L)	0.52 \pm 0.05	14.66 \pm 0.60	0.70 \pm 0.07	0.61 \pm 0.07
抗HBe (kNCU/L)	0	0.61 \pm 0.05	1.31 \pm 0.09	0.68 \pm 0.08
抗HBs (IU/L)	0	0	0	9.23 \pm 0.14

与表达及致病作用可分层次系统研究等特点. HBV转基因小鼠不仅可以研究HBV感染过程和感染后的免疫病理改变^[11], 还有助于发展新的

抗病毒治疗方法^[12-13]. 但HBV转基因鼠存在一些缺陷, 如HBV是整合在宿主染色体上的, 没有经过和靶细胞受体结合穿透的过程, 与自然感染

■名词解释

流体动力学法(hydrodynamics):指将单纯的未用病毒等载体包装的质粒DNA通过尾静脉注射入动物,短时间内全身各检测器官外源基因均得到有效表达(1 wk内均有表达,8 h达高峰),其中肝组织外源基因表达产量最高。其原理是快速注射的大剂量溶液量超过了心输出量,产生高流体静脉压,使得溶有质粒DNA的溶液较快流向全身各组织;同时质粒DNA与血液的短间接接触避免了血液中的大量核酶的降解。而肝脏是机体最大的脏器,组织结构疏松易于扩张,因而基因表达产物最丰富。

不同;操作复杂,整体费用高等。Liu *et al*^[2-3]用流体动力学法(hydrodynamics)将单纯的未用病毒等载体包装的质粒DNA通过尾静脉注射入小鼠,短时间内全身各检测器官外源基因均得到有效表达(1 wk内均有表达,8 h达高峰),其中肝组织外源基因表达产量最高。这种方法的技术要点是注射的质粒DNA溶于大剂量生理溶液(约为小鼠体质量的8%-12%,和整个小鼠的血容量相当),并于短时间注射完毕(4-8 s)。流体动力学法的原理是快速注射的大剂量溶液量超过了心输出量,因而溶液储积于上腔静脉,随之产生高流体静脉压,使得溶有质粒DNA的溶液较快流向全身各组织;同时质粒DNA与血液的短间接接触避免了血液中的大量核酶的降解。而肝脏是机体最大的脏器,组织结构疏松易于扩张,因而基因表达产物最丰富。流体动力学法注射的是质粒DNA,一般实验室能常规制备,免除了载体方法转移基因所需的繁琐病毒载体准备、纯化及安全性等问题;而以前采用的局部注射质粒DNA法,需定点注射或外科手术^[14-20],并且基因表达产量不高,因而流体动力学法是一种简便有效的外源基因转移方法,可广泛用于研究基因功能、基因调节和蛋白表达等许多领域,尤其对于嗜肝表达基因更显示出优越性。

Yang *et al*^[21]采用流体动力学法注射HBV质粒,成功构建了急性HBV感染的小鼠模型。作者同时尾静脉注射pT-MCS-HBV1.3和促进基因整合的转座子质粒pCMV-SB。注射后第1天,肝组织各种转录本,3.5, 2.4和2.1 kb表达达高峰,伴随着血清中产生高滴度的HBsAg和HBeAg,5.7%肝细胞HBcAg阳性,此时肝组织病毒复制中间体(单链DNA)少。到第4天,病毒RNA大量减少,血清中HBsAg和HBeAg的产量随之降低,而病毒复制中间体(单链DNA)则相当丰富,是3.5 kb转录本逆转录的结果。HBV RNA和DNA复制中间体的量从第4天到第7天维持稳定的水平,血清中HBsAg和HBeAg在这期间逐渐减少至消失,并依次出现了抗HBc、抗HBe和抗HBs(类似于人体HBV自然感染),因而作者认为后期病毒抗原的减少是抗体出现即动物免疫反应的结果。血清中HBV DNA在第1天未出现,第3天约 1.5×10^9 copies/L,第6天量最多约 8×10^9 copies/L,而此后渐渐减少。Suzuki *et al*^[22]用同样方法将1.5倍长度adw2亚型HBV基因组注射入5 wk BALB/c♀小鼠,约3%的肝细胞表达HBcAg;HBV DNA在血液内持续1 wk,HBsAg

持续2 wk,随后可检测到表面抗体。国内吴莹 *et al*^[23]亦用此法建立了急性HBV感染动物模型。该模型的优点是:方法简单易行,各种乙肝标志物表达产量均较高;区别于Guidotti^[10]建立的HBV转基因模型的泛嗜性,该模型HBV具有肝特异性;该模型的许多特点类似于人体自然感染HBV的过程,因而对于深入研究人体对HBV的免疫反应有重要帮助。但该模型亦存在不足,他是急性HBV感染的动物模型,不能用来研究慢性HBV感染者,另外,这种小鼠肝组织内也不能测到HBV共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)。

本实验为国内较早采用流体动力学法进行外源基因转移。尾静脉注射pcDNA3.1-HBV(未注射pCMV-SB),注射后第1天,血清中产生的HBsAg和HBV DNA达高峰,肝细胞HBcAg阳性率远远大于Yang构建的小鼠模型,平均达到75.0%,同时观察了HBsAg表达情况,其阳性率达到89.9%,与Song *et al*^[24]构建模型的外源基因在肝细胞表达率相似,这与采用的动物种属、质粒种类等原因有关。该模型HBeAg表达量少,可能原因如下:未同时注射转座子质粒pCMV-SB;Yang采用的真核表达质粒与pcDNA3.1相比能较好促进HBeAg在动物体内表达;实验动物不同等。与Yang的模型类似,随着时间的延长,血清中的HBsAg逐渐减少至消失,依次出现了抗HBc,抗HBe和抗HBs,但HBV DNA并没有逐渐升高而是降低的,可能与仅注射HBV质粒有关。肝细胞HBcAg阳性率在第3天和第7天分别为50.1%和31.8%,并且可明显观察到HBcAg的分布从第1天小叶周边转向第3天小叶中央静脉周围;HBsAg阳性率在第3天和第7天也很高,分别为80.0%和59.8%。并且从第7天开始,肝组织也出现炎性细胞浸润。总之,该模型HBsAg表达丰富;虽然血清HBeAg表达量低,但血清HBV DNA滴度较高,肝组织HBcAg表达丰富,能较好反应HBV复制水平。因而,我们成功构建了一种简便、有效、稳定的HBV感染动物模型,为进一步研究RNA干扰^[25-26]动物体内抗HBV打下坚实的基础。

4 参考文献

- 1 Lok AS. Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *J Hepatol* 2000; 32: 89-97
- 2 Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999; 6: 1258-1266

- 3 Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 1735-1737
- 4 Wieland SF, Spangenberg HC, Thimme R, Purcell RH, Chisari FV. Expansion and contraction of the hepatitis B virus transcriptional template in infected chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 2129-2134
- 5 Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. *Hepatology* 1995; 22: 1316-1325
- 6 Wirth S, Guidotti LG, Ando K, Schlicht HJ, Chisari FV. Breaking tolerance leads to autoantibody production but not autoimmune liver disease in hepatitis B virus envelope transgenic mice. *J Immunol* 1995; 154: 2504-2515
- 7 Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, Chisari FV. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 1995; 69: 6158-6169
- 8 Huang SN, Chisari FV. Strong, sustained hepatocellular proliferation precedes hepatocarcinogenesis in hepatitis B surface antigen transgenic mice. *Hepatology* 1995; 21: 620-626
- 9 Moriya K, Matsukura M, Kurokawa K, Koike K. *In vivo* inhibition of hepatitis B virus gene expression by antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218: 217-223
- 10 Guidotti LG, Matzke B, Chisari FV. Hepatitis B virus replication is cell cycle independent during liver regeneration in transgenic mice. *J Virol* 1997; 71: 4804-4808
- 11 Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I, Blum HE. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 1996; 24: 1-5
- 12 Julander JG, Sidwell RW, Morrey JD. Characterizing antiviral activity of adefovir dipivoxil in transgenic mice expressing hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2002; 55: 27-40
- 13 Julander JG, Colonno RJ, Sidwell RW, Morrey JD. Characterization of antiviral activity of entecavir in transgenic mice expressing hepatitis B virus. *Antiviral Res* 2003; 59: 155-161
- 14 Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; 247: 1465-1468
- 15 Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, Sih TR, Knoell D, Szoka FC, Walzem R, Carlson DM, Powell JS. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum Gene Ther* 1994; 5: 1477-1483
- 16 Zhang G, Vargo D, Budker V, Armstrong N, Knechtle S, Wolff JA. Expression of naked plasmid DNA injected into the afferent and efferent vessels of rodent and dog livers. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1763-1772
- 17 Budker V, Zhang G, Knechtle S, Wolff JA. Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes. *Gene Ther* 1996; 3: 593-598
- 18 Meyer KB, Thompson MM, Levy MY, Barron LG, Szoka FC Jr. Intratracheal gene delivery to the mouse airway: characterization of plasmid DNA expression and pharmacokinetics. *Gene Ther* 1995; 2: 450-460
- 19 Li K, Welikson RE, Vikstrom KL, Leinwand LA. Direct gene transfer into the mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1499-1504
- 20 Choate KA, Khavari PA. Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. *Hum Gene Ther* 1997; 8: 1659-1665
- 21 Yang PL, Althage A, Chung J, Chisari FV. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13825-13830
- 22 Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, Ishida H, Jinushi M, Miyagi T, Sasaki Y, Hayashi N. Intravenous injection of naked plasmid DNA encoding hepatitis B virus (HBV) produces HBV and induces humoral immune response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 784-788
- 23 吴莹, 黄爱龙, 唐霓, 张秉强, 卢年芳. 应用RNA干扰治疗小鼠急性乙型肝炎病毒感染. 中华医学杂志 2005; 85: 630-634
- 24 Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 2003; 9: 347-351
- 25 李宁, 范学工. RNA干扰的抗病毒效应. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1769-1772
- 26 朱才, 范学工, 李宁, 应若素. RNA干扰抑制乙型肝炎病毒复制的实验研究. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 522-525

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ASC在大鼠胰腺炎肺损伤发病中的作用及中药清胰汤对其表达的影响

任双义, 陈海龙

■背景资料

急性胰腺炎肺损伤的发病机制与IL-1 β 大量释放关系密切, IL-1 β 的释放与Caspase-1有关, ASC具有激活Caspase-1的作用, 这一炎症反应过程已被实验证实。但是, ASC是否通过激活Caspase-1增加IL-1 β 的释放导致胰腺炎肺损伤尚未见报道。

任双义, 大连医科大学附属第二医院普外科 辽宁省大连市 116023

陈海龙, 大连医科大学附属第一医院普外科 辽宁省大连市 116011

任双义, 医学硕士, 博士在读, 从事普通外科和中西医结合外科临床研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271667

通讯作者: 陈海龙, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路222号, 大连医科大学附属第一医院普外科。rsydl@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-11-30 接受日期: 2005-12-24

Role of apoptosis-associated speck-like protein containing a Caspase recruitment domain in pathogenesis of lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats and effect of Qingyitang on its expression

Shuang-Yi Ren, Hai-Long Chen

Shuang-Yi Ren, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, Liaoning Province, China

Hai-Long Chen, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271667

Correspondence to: Hai-Long Chen, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. rsydl@yahoo.com.cn

Received: 2005-11-30 Accepted: 2005-12-24

Abstract

AIM: To study the pathogenesis of ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a Caspase recruitment domain) in acute lung injury (ALI) induced by severe acute pancreatitis (SAP) and the effect of Chinese medicine Qingyitang on the expression of ASC and cytokines in rats.

METHODS: Forty Sprague Dawley (SD) rats were randomized into four groups: sham operation group (SHAM, $n = 10$), ALI models (ALI, $n = 10$), ALI + Sandostatin (SS, $n = 10$), ALI + Qingyitang (QYT, $n = 10$). ALI during SAP was induced by retrograde infusion of 15 g/L so-

dium deoxycholate into the bili-pancreatic duct in SD rats. All the rats were killed 24 hours after operation and treatment. Serum amylase was measured by an automated HITACHI analyzer. The level of myeloperoxidase (MPO) in pulmonary tissues was measured by enzyme chemistry assay. Serum interleukin-1 β (IL-1 β) protein was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of ASC mRNA and protein in pulmonary and pancreatic tissues were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry, respectively. The severity of pulmonary injuries was evaluated by MPO, the ratio of wet to dry lung tissues and pathological changes of rat pulmonary tissues.

RESULTS: The serum amylase and IL-1 β protein levels were increased significantly in group ALI in comparison with those in SHAM group, respectively ($77\ 632 \pm 5934$ nkat/L vs $16\ 303 \pm 1450$ nkat/L and 386.26 ± 50.54 ng/L vs 99.11 ± 18.43 ng/L, both $P < 0.01$), but they were decreased significantly in QYT group ($17\ 420 \pm 1867$ nkat/L vs $77\ 632 \pm 5934$ nkat/L, 105.23 ± 20.21 ng/L vs 386.26 ± 50.54 ng/L, both $P < 0.01$) and group SS ($20\ 437 \pm 123$ nkat/L vs $77\ 632 \pm 5934$ nkat/L and 109.63 ± 19.98 ng/L vs 386.26 ± 50.54 ng/L, both $P < 0.01$) as compared with those in ALI group. The expression of ASC mRNA and protein were highly up-regulated in ALI group as compared with those in SHAM group (24.86 ± 5.23 vs 54.12 ± 7.91 , $P < 0.01$), but they were down-regulated in QYT group (49.48 ± 8.13 vs 24.86 ± 5.23 , $P < 0.01$) and SS group (48.69 ± 5.87 vs 24.86 ± 5.23 , $P < 0.01$). The level of MPO (18.67 ± 1.17 nkat/g vs 4.68 ± 0.33 nkat/g, $P < 0.01$), the ratio of wet to dry lung tissues (9.98 ± 0.47 vs 6.32 ± 0.28 , $P < 0.01$) and pathological changes of rat pulmonary tissues were increased significantly in ALI group in comparison with those in SHAM group, correlating with the severity of SAP, but they were decreased in QYT group (5.33 ± 0.50 nkat/g vs 18.67 ± 1.17 nkat/g and 7.02 ± 0.34 vs 9.98 ± 0.47 , both $P < 0.01$) and group SS (5.16 ± 0.83 nkat/g vs 18.67 ± 1.17 nkat/g and 6.78 ± 0.33 vs $9.98 \pm$

0.47, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: The expression of ASC plays an important role in the pathogenesis of ALI induced by SAP. *Qingyitang* can protect lung from ALI induced by SAP by decreasing the expression of ASC and release of IL-1 β in rats.

Key Words: Acute lung injury; Severe acute pancreatitis; ASC; Interleukin-1 β

Ren SY, Chen HL. Role of apoptosis-associated speck-like protein containing a Caspase recruitment domain in pathogenesis of lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats and effect of *Qingyitang* on its expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(11):1058-1063

摘要

目的: 探讨ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing a Caspase recruitment domain)在胰腺炎肺损伤发病机制中的作用及中药清胰汤对胰腺炎肺损伤大鼠ASC及其相关的细胞因子表达的影响。

方法: SD大鼠40只, 随机分4组: 假手术组、胰腺炎肺损伤组、清胰汤治疗组、善宁治疗组。采用15 g/L去氧胆酸钠逆行注入胰胆管诱发胰腺炎肺损伤模型。通过自动生化分析仪检测大鼠血清淀粉酶; 采用ELISA法测定血清IL-1 β 水平; RT-PCR检测肺组织ASC mRNA的表达; 免疫组织化学法检测肺组织和胰腺组织ASC蛋白的表达。通过检测肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性、肺湿/干质量比值和肺组织病理切片判定肺损伤程度。

结果: 胰腺炎肺损伤组血清淀粉酶和IL-1 β 水平较假手术组显著升高($77\,632 \pm 5934$ nkat/L vs $16\,303 \pm 1450$ nkat/L, $P < 0.01$ 和 386.26 ± 50.54 ng/L vs 99.11 ± 18.43 ng/L, $P < 0.01$)。清胰汤治疗组血清淀粉酶($17\,420 \pm 1867$ nkat/L)和IL-1 β (105.23 ± 20.21 ng/L)水平较肺损伤组血清淀粉酶($77\,632 \pm 5934$ nkat/L, $P < 0.01$)和IL-1 β 水平(386.26 ± 50.54 ng/L, $P < 0.01$)明显下降。善宁治疗组血清淀粉酶($20\,437 \pm 123$ nkat/L)和IL-1 β 水平(109.63 ± 19.98 ng/L)较肺损伤组血清淀粉酶($77\,632 \pm 5934$ nkat/L, $P < 0.01$)和IL-1 β 水平(386.26 ± 50.54 ng/L, $P < 0.01$)明显下降。假手术组肺组织内ASC mRNA表达较弱。胰腺炎肺损伤组肺组织及胰腺组织内ASC蛋白表达较假手术组显著上调, 其灰度值有显著性差异(24.86 ± 5.23 vs 54.12 ± 7.91 , $P < 0.01$ 和 25.46 ± 4.21 vs 52.32 ± 8.10 , $P < 0.01$)。清胰汤治疗组两者表达显著下调(48.97 ± 7.45 vs 24.86

± 5.23 , $P < 0.01$ 和 49.48 ± 8.13 vs 25.46 ± 4.21 , $P < 0.01$)。善宁治疗组两者的表达亦显著下调(48.69 ± 5.87 vs 24.86 ± 5.23 , $P < 0.01$ 和 49.11 ± 6.41 vs 25.46 ± 4.21 , $P < 0.01$)。清胰汤治疗组和善宁治疗组肺组织MPO活性减低(5.33 ± 0.50 nkat/L vs 18.67 ± 1.17 nkat/L, $P < 0.01$ 和 5.16 ± 0.83 nkat/L vs 18.67 ± 1.17 nkat/L, $P < 0.01$)。肺湿/干质量比值下降(7.02 ± 0.34 vs 9.98 ± 0.47 , $P < 0.01$ 和 6.78 ± 0.33 vs 9.98 ± 0.47 , $P < 0.01$)。肺组织损害程度明显减轻。

结论: ASC在大鼠胰腺炎肺损伤发病机制中起到一定的作用, 中药清胰汤通过下调ASC及其相关细胞因子IL-1 β 的表达起到治疗胰腺炎肺损伤的作用。

关键词: 重症急性胰腺炎; 肺损伤; ASC; 白细胞介素1

任双义, 陈海龙. ASC在大鼠胰腺炎肺损伤发病中的作用及中药清胰汤对其表达的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(11):1058-1063

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1058.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)合并急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的死亡率较高^[1-2], 其发病机制尚未完全明了。研究证明, 其发病机制与细胞因子特别是白细胞介素-1 β (IL-1 β)的过度产生有重要关系^[3-4], 而IL-1 β 的产生依赖于半胱氨酸蛋白酶-1(又称白细胞介素-1转化酶, Caspase-1/ICE)^[5-7], Caspase-1的活化有赖于ASC(apoptosis-associated speck-like protein containing Caspase recruitment domain)^[8-12], ASC是否在SAP时ALI的发病机制中起一定的作用, 目前尚未见报道。我们应用大鼠制成SAP诱发ALI模型, 探讨ASC在SAP诱发ALI时的发病机制, 并应用中药清胰汤对胰腺炎肺损伤大鼠进行治疗, 通过观察ASC表达的变化, 探讨清胰汤治疗胰腺炎肺损伤的机制, 为临床更好的应用清胰汤治疗胰腺炎肺损伤奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠40只(大连医科大学实验动物中心提供), 雌雄不限, 清洁级, 体质量220-250 g。随机分为4组, 每组10只大鼠: 假手术组(SHAM组), 胰腺炎肺损伤组(ALI组), 中药清胰汤治疗组(QYT), 善宁治疗组(SS)。以15 g/L去氧胆酸钠逆行注入胰胆管诱发胰腺炎肺损伤模

■创新盘点

本文通过动物实验验证了ASC与胰腺炎肺损伤有关, 并通过药物干预探讨对胰腺炎肺损伤的治疗。

■应用要点

本研究为今后在治疗胰腺炎肺损伤中,能够对炎症反应过程中早期阻断炎症反应通路(如ASC抑制物的研究)提供部分参考。

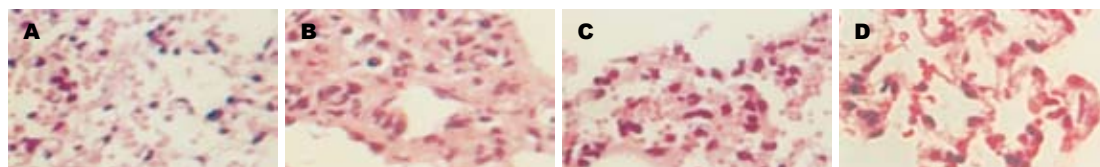


图1 肺组织病理形态学改变(×200). A: ALI组; B: QYT组; C: SS组; D: SHAM组.

型. 术前动物禁食12 h, 不禁水. 用20 g/L氯胺酮(100 mg/kg)腹腔注射麻醉. 无菌条件下正中切口入腹, 在十二指肠乳头对侧肠壁插入1 mL小注射器针头经胆胰管十二指肠乳头开口入胆胰管, 同时在胆管出肝门处用小动脉夹夹闭, 逆行注入15 g/L去氧胆酸钠(1 mL/kg)30 s注射完毕. SHAM组剖腹后只翻动胰腺, 不注射药物. 清胰汤治疗组在造模后立即灌胃给清胰汤(清胰汤组成: 茵陈20 g、栀子20 g、大黄20 g、芒硝20 g、木香15 g、柴胡5 g、元胡15 g、白芍15 g、甘草6 g、当归15 g、双花20 g、连翘20 g, 由大连医科大学附属第二医院中药制剂室制成浓度为1 kg/L, 灭菌处理后置瓶装冰箱存放). 造模后12 h再次灌胃1次剂量: 10 mL/kg. 善宁治疗组: 分别于造模后立即皮下注射1次及造模后12 h再次皮下注射1次, 剂量: 20 μg/kg; 在制模后24 h, 下腔静脉采血3-4 mL, 离心(4000 r/min, 10 min), 获血清, 置-70℃冷藏备用. 取右肺下叶肺组织和相同部位胰腺组织行RT-PCR检测. 另取胰腺组织和右上叶肺组织甲醛固定、石蜡包埋.

1.2 方法

1.2.1 肺湿/干质量比值测定 动物放血致死后取左肺叶称湿质量, 置60℃烤箱连续烘烤24 h, 去除水分称肺干质量. 肺湿质量系数 = (肺湿质量-肺干质量)/肺干质量×100%.

1.2.2 肺组织MPO活性测定 采用酶化学法, 按试剂盒(南京建成生物工程研究所提供)操作程序进行.

1.2.3 血清淀粉酶水平测定 采用酶法, 由HITACHI自动生化分析仪测定.

1.2.4 RT-PCR检测肺组织ASC表达 采用Trizol试剂(GibcoBRL公司提供)抽提大鼠新鲜肺组织总RNA. RT-PCR反应采用一步法(试剂盒由大连宝生物工程公司提供). PCR反应条件: 94℃预变性1 min, 98℃变性10 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸70 s, 循环30次, 72℃延伸70 s, 最后降至4℃结束反应. ASC引物由大连宝生物公司合成, 引物序列如下: ASC(526 bp): 上游: 5'-CACGAGATG

CCATCCTGGAC-3'; 下游: 5'-AAGGCCTCAAGGAACAAGT-3'. 将PCR产物在琼脂糖凝胶中电泳后采用凝胶成像系统摄影.

1.2.5 胰腺和肺组织ASC蛋白免疫组织化学检测 采用S-P法 用PBS代替一抗作为阴性对照. 结果判定标准: 每只大鼠胰腺和肺组织标本取两张切片置于Olympus多功能显微镜(Olympus BX51, Japan)观察并摄像. 在0.5 cm×1.0 cm的样品截面上, 每张切片随机选择5个高倍视野, 应用CA6300彩色图像分析系统进行定量灰度扫描, 求出给定面积内的灰度值. 染色愈深, 在监视器上愈暗, 灰度值愈小.

1.2.6 血清IL-1β定量测定 采用ELISA法, 按试剂盒(B&C公司提供)操作程序进行.

统计学处理 所有数据以mean±SD表示. 通过SPSS 11.0统计软件, 采用单因素方差分析对各组均数进行显著性检验, $P<0.05$ 具有显著性差异.

2 结果

2.1 肺组织病理形态学改变 光镜下SHAM组肺组织正常, 而ALI组肺泡壁增厚, 肺间质水肿, 大量炎性细胞浸润. ALI模型组可见肺间质高度充血, 大部分肺泡间隔明显增宽, 肺泡腔部分融合, 部分萎缩. 肺间质大量中性粒细胞浸润, 尤以小静脉和小支气管周围多见. 部分小支气管上皮细胞脱落腔内有红细胞. 两治疗组肺组织炎症反应明显减轻(图1).

2.2 肺湿/干质量比值测定 ALI组肺湿/干质量比值明显增加, 与对照组比有显著性差异($P<0.01$), 两治疗组与ALI组比较有显著性差异($P<0.01$), 而两组之间无明显差异($P>0.05$)(表1).

2.3 肺组织MPO活性测定结果 ALI组MPO活性明显增高, 与SHAM组比较差异有显著性($P<0.01$). 而两治疗组明显下降, 与ALI组比较差异有显著性($P<0.01$). 两治疗组之间无显著性差异(表1).

2.4 血清淀粉酶的变化 SHAM组血清淀粉酶水平较低; ALI组血清淀粉酶水平显著升高, 与

表 1 实验大鼠各项检查指标检验结果比较 (mean ± SD)

组别	n	血淀粉酶 (nkat/L)	肺湿/干质量比	ASC胰腺 (灰度)	ASC肺脏 (灰度)	肺MPO (nkat/g)	IL-1 β (pg/mL)
SHAM组	10	16 303 ± 1450	6.32 ± 0.28	52.32 ± 8.10	54.12 ± 7.91	4.68 ± 0.33	99.11 ± 18.43
ALI组	8	77 632 ± 5934 ^d	9.98 ± 0.47 ^d	25.46 ± 4.21 ^d	24.86 ± 5.23 ^d	18.67 ± 1.17 ^d	386.26 ± 50.54 ^d
QYT组	9	17 420 ± 1867 ^b	7.02 ± 0.34 ^b	48.97 ± 7.45 ^b	49.48 ± 8.13 ^b	5.33 ± 0.50 ^b	105.23 ± 20.21 ^b
SS组	8	20 437 ± 123 ^b	6.78 ± 0.33 ^b	49.11 ± 6.41 ^b	48.69 ± 5.87 ^b	5.16 ± 0.83 ^b	109.63 ± 19.98 ^b

^b $P < 0.01$ vs SHAM; ^d $P < 0.01$ vs ALI. 造模后24 h ALI组、QYT组和SS组大鼠分别死亡2、1和2只。

SHAM组相比, 其差异有显著性($P < 0.01$). 两治疗组血清淀粉酶水平较ALI组明显降低($P < 0.01$)(表1).

2.5 RT-PCR方法检测肺组织ASC的表达 SHAM组肺组织内ASC mRNA表达较弱; ALI组肺组织内ASC mRNA的表达明显上调, 而两治疗组与ALI组比较表达明显下调, 两治疗组间ASC mRNA表达无明显差异(图2).

2.6 胰腺和肺组织ASC蛋白免疫组织化学检测结果 SHAM组胰腺组织和肺组织内可见ASC蛋白表达; ALI组胰腺和肺组织内ASC蛋白的表达明显上调, 与SHAM组比较, 其灰度值差异均具有显著性($P < 0.01$), 而两治疗组与ALI组比较差异有显著性($P < 0.01$), 两组间ASC蛋白表达的差异无显著性意义($P > 0.05$)(图3, 图4, 表1).

2.7 血清IL-1 β 水平的变化 SHAM组血清IL-1 β 水平较低; ALI组血清IL-1 β 水平升高, 与SHAM组相比, 其差异有显著性($P < 0.01$). 两治疗组血清IL-1 β 水平较ALI组明显降低($P < 0.01$), 而两组之间无显著差异. 两治疗组与SHAM组之间无显著差异(表1).

3 讨论

SAP合并ALI的发病机制尚未完全明了. 目前认为, 重症急性胰腺炎实质上是一种严重的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 其机制是由于不同的致病因子引起胰腺腺泡细胞的损伤, 引发活性胰酶的释放和单核巨噬细胞的激活, 过度激活中性粒细胞和巨噬细胞, 释放大炎症介质包括细胞因子, 再通过这些炎症介质网络, 引起连锁和放大效应, 即所谓的级联效应(cascades), 导致多器官损害, 特别是肺功能的损害. 在众多的炎症细胞因子中, IL-1 β 和TNF- α 在SAP发病过程中起着重要的作用^[3], IL-1 β 是SAP时导致肺损伤重要的细胞因子, 而IL-1 β 的活化有赖于半胱氨酸蛋白酶-1(又称白细胞介素-1转化酶,

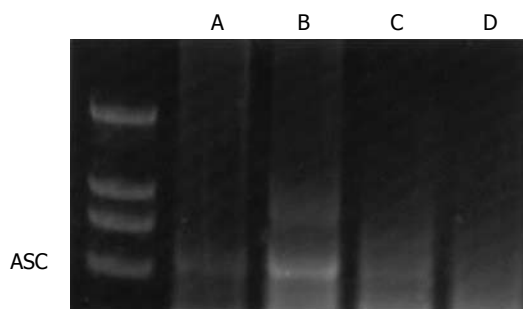


图 2 RT-PCR方法检测肺组织内ASC mRNA的表达. A: QYT组; B: ALI组; C: SS组; D: SHAM组.

Caspase-1/ICE). Caspase-1的主要功能之一是将分子量为31 kDa的IL-1 β 前体裂解为分子量为17 kDa的具有生物活性形式的IL-1 β , 从而造成炎症反应. Caspase-1的这种参与炎症反应的功能已被很多学者证明, 特别是在急性胰腺炎中, 并且应用Caspase-1抑制物治疗炎症已取得了一定的效果^[5-7]. Caspase-1作为炎症反应中的重要信号传导物质, 也具有活化形式和非活化形式, 在炎症反应过程中, Caspase-1前体转变成有活性的Caspase-1依赖于他的上游传导物质ASC^[8-12]. ASC是近几年发现的新的蛋白质, 他能诱导Caspase-1的活化, 从而与炎症反应有关. 许多上皮细胞和白细胞、毛囊、外周血淋巴细胞都表达ASC. 在严重的炎症部位, 中性粒细胞表达ASC升高. ASC在Caspase-1信号途径中发挥活化因子的作用. 而IL-1 β 的分泌是Caspase-1活化的结果之一, ASC通过直接与Caspase-1前体或其CARD(Caspase-1 recruitment domain)作用, 增加IL-1 β 的分泌.

大量的实验证明了ASC能诱导Caspase-1的活化, 从而证明了他参与炎症反应过程. 但是, ASC是否在胰腺炎肺损伤发病机制中起一定的作用, 尚未见报道. 本文即是基于上述原理推测ASC在急性胰腺炎肺损伤发病机制中起到一定的作用, 因而设计了上述实验. 实验结果显示, ASC在胰腺炎肺损伤大鼠肺组织和胰腺组织中

■名词解释

1 ASC: 含有Caspase补充结构域的、与凋亡有关的斑点样蛋白, 是炎症小体的重要组成部分. 他可以使无活性的Caspase-1前体转化为有活性的Caspase-1.

2 Caspase-1: 半胱氨酸蛋白酶又名白细胞介素-1转化酶, 他可以使IL-1 β 前体转化为有活性的IL-1 β , 参与炎症反应.

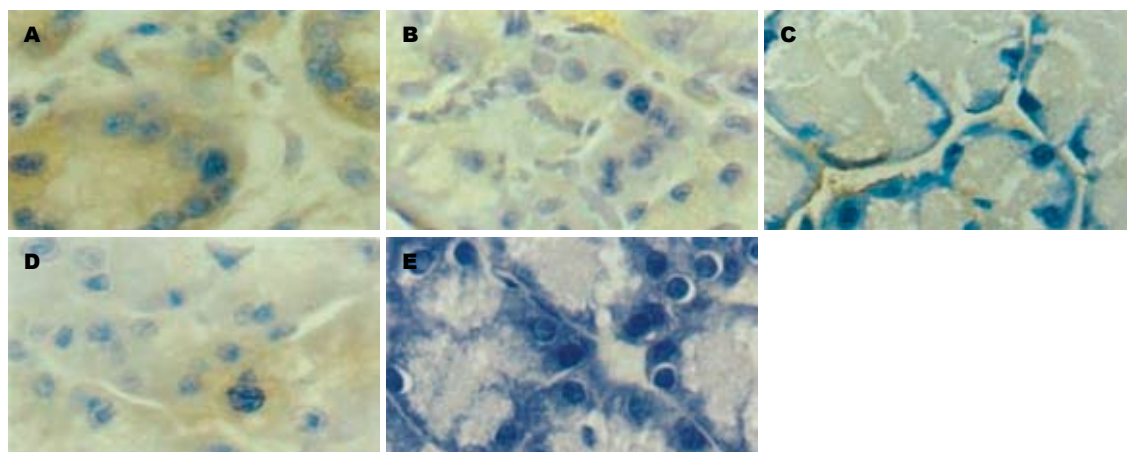


图3 胰腺组织ASC蛋白免疫组织化学检测结果($\times 400$). A: ALI组; B: QYT组; C: SHAM组; D: SS组; E: 阴性对照组.

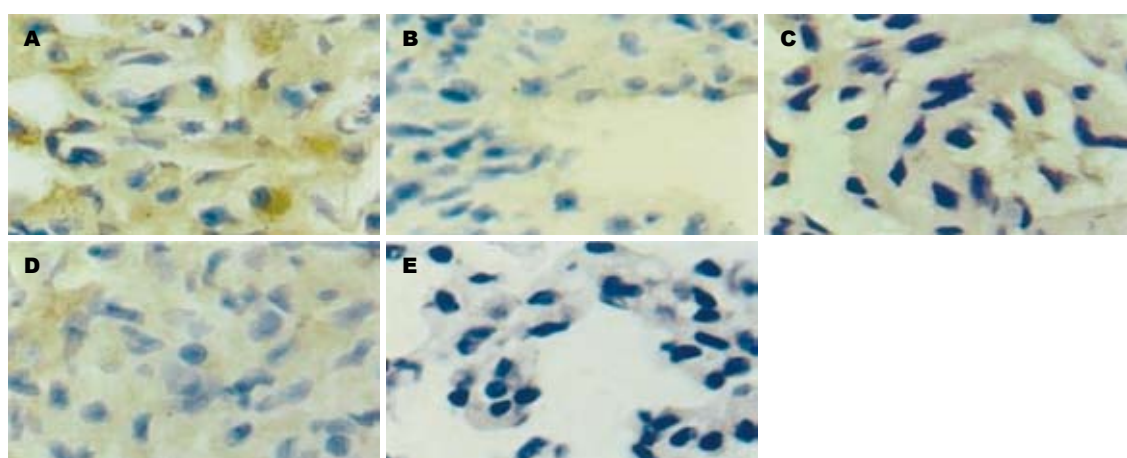


图4 肺组织ASC蛋白免疫组织化学检测结果($\times 200$). A: ALI组; B: QYT组; C: SHAM组; D: SS组; E: 阴性对照组.

较假手术组表达明显增强,同时伴有IL-1 β 和肺组织内MPO以及血清淀粉酶和肺湿/干质量比值明显增高,从而证明了ASC在胰腺炎肺损伤发病机制中起到一定的作用.通过15 g/L去氧胆酸钠逆行注入胆总管诱发胰腺炎肺损伤模型发现,血清IL-1 β 水平明显升高;胰腺和肺组织ASC的表达显著增强,同时,血清淀粉酶水平增高.免疫组化结果显示ASC染色阳性细胞主要位于胰腺组织坏死区域和肺内炎性细胞浸润区.提示ASC的激活、IL-1 β 分泌增加与SAP时肺损伤有密切关系.结合肺组织MPO水平及胰腺组织的病理形态学改变,推测ASC裂解IL-1 β 前体使之分泌增加在SAP诱发肺损伤发病过程中均起到一定的作用.具有活性的IL-1 β 发病早期在胰腺和肺组织内释放和合成,是介导中性粒细胞和巨噬细胞引起组织损伤的重要炎症介质,同时由于SAP的发生导致全身炎症反应综合征的出现,诱使肺组织内浸润大量的中性粒细胞和巨噬细胞,因而产生了大量的细胞因子,特别是IL-

1 β 的大量产生,是导致肺损伤的重要因素之一.因而,SAP时IL-1 β 产生的高低是判定胰腺炎肺损伤严重程度的重要指标.

临床上SAP的治疗是个难点,目前通常采用个体化的综合治疗方案,其中,中医中药治疗SAP是一个很重要的方面,临床上已有了肯定的疗效,特别是中药清胰汤治疗胰腺炎,经过广大中西医结合急腹症外科的临床科研工作者的不懈努力,已经证实了清胰汤在治疗SAP方面的有效作用^[13-14].中医理论认为,肺与大肠相表里.若肺气被邪毒所遏,失其宣肃,则喘促息数.传入阳明与肠道糟粕搏结,肺气不通而浊气又不能从下而出,扰乱了肺与大肠相表里的生理状态而出现喘满症.而清胰汤可泻下热结,荡涤积滞,通畅腑气.其通腑利肠泻肺实,使肺气得以宣发肃降.清胰汤具有通里攻下的作用,这在治疗SAP时具有积极的治疗效果.他可以通过改善胃肠道的功能,促进内毒素的排泄减少炎症介质和细胞因子的产生和吸收,从而减轻全身重

要器官的损害, 达到治疗目的. 中药清胰汤治疗胰腺炎肺损伤有报道^[15], 但是其治疗机制研究较少. 清胰汤是否可以通过影响ASC及其激活的细胞因子达到治疗胰腺炎肺损伤的作用, 尚未见报道. 既然ASC在胰腺炎肺损伤发病中具有一定的作用, 那么应用中药清胰汤是否可以下调ASC的表达, 从而达到治疗胰腺炎的作用呢? 我们采用临床上常用的中药清胰汤方剂对胰腺炎肺损伤大鼠进行治疗, 通过设立阴性对照组(假手术组)和阳性对照组(善宁治疗组)观察以上指标来判定中药清胰汤是否可以通过减少细胞因子来治疗胰腺炎肺损伤, 判定其是否对ASC及其相关的细胞因子具有影响, 从而达到治疗胰腺炎肺损伤的目的. 善宁即生长抑素衍生物, 其化学名称奥曲肽, 具有通过影响细胞因子治疗SAP肺损伤的作用^[16], 因而作为阳性对照组具有可靠性. 为了判定肺损伤程度, 我们通过测定肺组织内MPO活性和肺湿/干质量比值这两项反映肺损伤程度的指标来判定肺损伤程度是否与血清内IL-1 β 、肺组织内ASC mRNA和ASC蛋白的表达相平行, 并且通过检测肺组织病理切片来判定肺损伤程度是否与细胞因子的测定值具有一致性. 结果表明, 肺损伤的严重程度与血清IL-1 β 测得值以及肺组织内ASC mRNA和ASC蛋白的表达程度相平行, 并与血清内淀粉酶活性相一致, 并且肺组织内和胰腺组织内ASC蛋白表达相一致. 从实验结果看, 中药清胰汤可以减少血清内IL-1 β , 下调肺组织内ASC mRNA和肺及胰腺组织内ASC蛋白的表达, 并且与降低肺组织内MPO活性和肺湿/干质量比值相平行. 从而提示, 减少血清内IL-1 β , 下调肺组织内ASC mRNA和ASC蛋白的表达是中药清胰汤治疗胰腺炎肺损伤的重要机制之一.

4 参考文献

- 1 Mayerle J, Hlouschek V, Lerch MM. Current management of acute pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005; 2: 473-483
- 2 Surbatovic M, Jovanovic K, Radakovic S, Filipovic N. Pathophysiological aspects of severe acute pancreatitis-associated lung injury. *Srp Arh Celok Lek* 2005; 133: 76-81
- 3 Bhatia M, Moomchala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; 202: 145-156
- 4 Mozo G, del Olmo ML, Caro-Paton A, Reyes E, Manzano L, Belmonte A, Alvarez-Mon M. Lung changes and cytokine levels in a model of experimental acute pancreatitis. *Rev Esp Enferm Dig* 2002; 94: 53-66
- 5 Paszkowski AS, Rau B, Mayer JM, Moller P, Beger HG. Therapeutic application of caspase 1/interleukin-1 β -converting enzyme inhibitor decreases the death rate in severe acute experimental pancreatitis. *Ann Surg* 2002; 235: 68-76
- 6 Norman J, Yang J, Fink G, Carter G, Ku G, Denham W, Livingston D. Severity and mortality of experimental pancreatitis are dependent on interleukin-1 converting enzyme (ICE). *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 113-118
- 7 Rau B, Paszkowski A, Lillich S, Baumgart K, Moller P, Beger HG. Differential effects of caspase-1/interleukin-1 β -converting enzyme on acinar cell necrosis and apoptosis in severe acute experimental pancreatitis. *Lab Invest* 2001; 81: 1001-1013
- 8 Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri ES. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 21119-21122
- 9 Stehlik C, Lee SH, Dorfleutner A, Stassinopoulos A, Sagara J, Reed JC. Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation. *J Immunol* 2003; 171: 6154-6163
- 10 Yu JW, Wu J, Zhang Z, Datta P, Ibrahim I, Taniguchi S, Sagara J, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Cryopyrin and pyrin activate caspase-1, but not NF-kappaB, via ASC oligomerization. *Cell Death Differ* 2006; 13: 236-249
- 11 Yamamoto M, Yaginuma K, Tsutsui H, Sagara J, Guan X, Seki E, Yasuda K, Yamamoto M, Akira S, Nakanishi K, Noda T, Taniguchi S. ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR-associated signal adaptor molecules. *Genes Cells* 2004; 9: 1055-1067
- 12 Bruey JM, Bruey-Sedano N, Newman R, Chandler S, Stehlik C, Reed JC. PAN1/NALP2/PYPAF2, an inducible inflammatory mediator that regulates NF-kappaB and caspase-1 activation in macrophages. *J Biol Chem* 2004; 279: 51897-51907
- 13 Li ZL, Wu CT, Lu LR, Zhu XF, Xiong DX. Traditional Chinese medicine Qing Yi Tang alleviates oxygen free radical injury in acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 357-359
- 14 Li YY, Li XL, Yang CX, Zhong H, Yao H, Zhu L. Effects of Tetradrine and QYT on ICAM-1 and SOD gene expression in pancreas and liver of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 155-159
- 15 闻庆平, 陈海龙, 关凤林. 中药清胰汤治大鼠重症急性胰腺炎时急性肺损伤的比较. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1341-1345
- 16 Paran H, Mayo A, Paran D, Neufeld D, Shwartz I, Zissin R, Singer P, Kaplan O, Skornik Y, Freund U. Octreotide treatment in patients with severe acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2247-2251

电编 张敏 编辑 张海宁

用SEREX方法筛选HCC抗原及hcct-19表达谱的检测

陈晓红, 陈智, 陈峰, 姚航平, 夏琦, 焦婧婧

■背景资料

SEREX法是鉴定肿瘤抗原最方便和高效的一种方法, 他的主要特点是适用于各种肿瘤及能迅速找到抗原的分子特征. 目前急需寻找新的HCC抗原分子及鉴定其表位.

陈晓红, 陈智, 陈峰, 姚航平, 夏琦, 焦婧婧, 浙江大学医学院附属第一医院传染病研究所 浙江省杭州市 310003

陈晓红, 2005年浙江大学内科学博士, 现在哈尔滨医科大学第一临床医学院感染科工作, 主治医师、讲师, 主要从事病毒性肝炎及原发性肝癌发病机制的研究.

通讯作者: 陈智, 310003, 浙江省杭州市庆春路79号, 浙江大学附属第一医院传染病研究所. chenzhi@zju.edu.cn

电话: 0571-87236580

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-12-24

Identification of hepatocellular carcinoma antigens by serological analysis of recombinant cDNA expression library and detection of hcct-19 expression in human tissues and cell lines

Xiao-Hong Chen, Zhi Chen, Feng Chen, Hang-Ping Yao, Qi Xia, Jing-Jing Jiao

Xiao-Hong Chen, Zhi Chen, Feng Chen, Hang-Ping Yao, Qi Xia, Jing-Jing Jiao, Institute of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University College of Medicine, Hangzhou 310003, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Zhi Chen, Institute of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University College of Medicine, 79 Qingchun Street, Hangzhou 310003, Zhejiang Province, China. chenzhi@zju.edu.cn

Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-12-24

Abstract

AIM: To identify hepatocellular carcinoma (HCC) antigens by serological analysis of recombinant cDNA expression library (SEREX) and observe the expression of hcct-19 in human tissues and cell lines.

METHODS: Firstly, a high-quality cDNA library from human HCC tissue was constructed successfully. *E.coli* transfected with recombinant λ Triplex₂ phages were plated onto LB-agar plates. The expression of recombinant proteins was induced with isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The membranes were blocked with BSA and incubated with a 1 : 1000 dilution of patient's serum, which had been preabsorbed with transfected *E.coli* phage lysate. Then they were incubated with a 1 : 5000

dilution of the alkaline phosphatase-conjugated antibody specific for human IgG. Reactive clones were visualized by staining with BCIP/NBT, and these clones were subcloned three times to obtain monoclonality. Secondly, positive clone plaques were randomly picked and tested using polymerase chain reaction (PCR) with universal primers derived from the sequence flanking the vector. PCR products were purified and sequenced, and the results were analyzed with BLAST software in comparison with the known genes in GenBank. Thirdly, the positive clone of hcct-19 gene expression was detected by PCR in normal human tissues of stomach, colon, liver, pancreas, kidney, uterus, testicle and bladder, human tumor tissues of colon carcinoma, renal carcinoma, pancreatic cancer, gastric carcinoma, prostatic carcinoma, HCC, ovarian cancer and lung cancer, and tumor cell lines of HepG₂, Hela, MGC-803, PANC-1, PC3, W-549 and SW-480, and semi-quantitative reverse transcription PCR was used to detect hcct-19 expression in HCC and cancer-adjacent tissues.

RESULTS: Firstly, thirty-one positive clones were obtained, representing fourteen different cDNA sequences (lengths from 324 to 805 bp). Ten cDNAs were genes with known functions, of which replication factor C 2, NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 4 and mitochondrial carrier triple repeat 1 were found to be associated with HCC for the first time. Secondly, the cloned hcct-19 was expressed in normal human tissues of stomach, large intestine, liver, pancreas, kidney, uterus, testicle and bladder, human tumor tissues of colon carcinoma, renal carcinoma, pancreatic cancer, gastric carcinoma, prostatic carcinoma, hepatocellular carcinoma, ovarian cancer and lung cancer, and tumor cell lines of HepG₂, Hela, MGC-803, PANC-1, PC3, W-549 and SW-480. The level of hcct-19 expression in HCC tissues was significantly higher than that in cancer-adjacent tissues (13.2 ± 2.7 vs 2.9 ± 0.3 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: HCC antigens identified from this study contribute to clarify the pathogenesis

of HCC, during which hcct-19 may serves as an overexpressed gene.

Key Words: Serological analysis of recombinant cDNA expression library; Hepatocellular carcinoma; Antigens; hcct-19; Expression; Human tissue; Cell lines

Chen XH, Chen Z, Chen F, Yao HP, Xia Q, Jiao JJ. Identification of hepatocellular carcinoma antigens by serological analysis of recombinant cDNA expression library and detection of hcct-19 expression in human tissues and cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(11):1064-1070

摘要

目的: 用SEREX方法鉴定HCC表达的肿瘤抗原, 检测hcct-19的表达谱。

方法: 将HCC表达文库铺板, IPTG诱导蛋白质表达, BSA封闭。同1:1 000稀释的预吸收HCC患者血清反应后, 与1:5 000稀释的羊抗人抗体反应, 在BCIP/NBT的作用下显色, 挑取阳性克隆噬菌斑, 重复筛选和铺板3次, 直至得到一致的单克隆免疫阳性重组噬菌体。挑取阳性克隆噬菌斑, 用载体克隆位点两端的通用引物进行PCR扩增, PCR产物纯化测序, 序列结果用BLAST软件同GenBank中的已知基因进行对比分析。检测阳性克隆抗原基因hcct-19在部分正常组织、肿瘤组织及肿瘤细胞株中的表达, 半定量RT-PCR方法检测阳性克隆抗原基因在肝癌及癌旁组织中的表达。

结果: 共得到31个阳性克隆, 代表14个不同的cDNA序列, 其中10个为已知功能的基因, 4个为未知功能的基因。在已知功能的基因中, RFC2、NDUFA4及MCART1首次被发现与HCC有关。hcct-19在部分正常组织、肿瘤组织及肿瘤细胞株中表达, 在肝癌组织中的表达强度明显高于癌旁组织(13.2 ± 2.7 vs 2.9 ± 0.3 , $P < 0.05$)。

结论: 本实验筛选出的HCC抗原有助于进一步阐明HCC的形成过程。hcct-19可能作为一个过量表达的基因参与了HCC的发病过程。

关键词: SEREX; 肝细胞癌; 抗原; hcct-19; 表达谱; 人组织; 细胞株

陈晓红, 陈智, 陈峰, 姚航平, 夏琦, 焦婧婧. 用SEREX方法筛选HCC抗原及hcct-19表达谱的检测. *世界华人消化杂志* 2006;14(11):1064-1070
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1064.asp>

0 引言

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)早期不易发现, 然而肿瘤细胞的改变可以被免疫细胞识别并被免疫系统排斥。用分子生物学和免疫的方法鉴定出这些改变的基因(肿瘤特异性/相关性抗原基因)和蛋白, 可为早期诊断及免疫治疗提供潜在的靶位。筛选肿瘤抗原的方法SEREX(serological analysis of recombinant cDNA expression library), 即重组克隆表达抗原的血清学鉴定技术, 最方便和高效。该方法是用癌症患者的抗体库来鉴别抗原分子^[1], 他的主要特点是适用于各种肿瘤及能迅速找到抗原的分子特征。

HCC发生、发展的分子基础之一是多基因表达的特点^[2]。总体上, 对HCC的抗原研究及以其作为疫苗行免疫治疗尚处于不成熟阶段, HCC的抗原及编码的基因还远不清楚, 急需寻找新的抗原分子及鉴定其表位。因此, 我们采用SEREX方法, 从高度分化的HCC组织中提取总RNA, 构建cDNA表达文库, 以HCC患者自体 and 异体的混合血清筛选文库, 鉴定HCC表达的肿瘤抗原。期望为HCC的早期诊断和预后提供新的标记物, 为HCC疫苗的研制及免疫效果监测打下基础, 并且为探讨肿瘤发生、发展的分子机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 正常人胃、大肠、肝脏、胰腺、肾脏、子宫、睾丸及膀胱组织标本, 人大肠癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、HCC、卵巢癌及肺癌组织标本, 人HCC组织及癌旁组织(癌组织5 cm以外)标本, 由浙江大学病理教研室、浙江大学附属二院外科及病理科提供, 并经病理证实。肝癌HepG₂细胞株、子宫颈癌Hela细胞株、胃癌MGC-803细胞株及胰腺癌PANC-1细胞株由浙江大学传染病研究所保存, 肺癌W549细胞株由浙江大学附属一院呼吸病研究所惠赠, 前列腺癌PC3细胞株由浙江大学免疫研究所惠赠, 大肠癌SW-480细胞株由浙江大学病理教研室惠赠。SMARTTM cDNA Library Construction Kit为美国Clontech公司产品, *E.coli* XL1-Blue为美国Clontech公司产品, *Escherichia coli* phage lysate为美国Stratagene公司产品, 碱性磷酸酶连接的Fc片段的特异性羊抗人抗体为美国SouthernBiotechnology Associates公司产品, RevertAidTM M-MuLV逆转录酶为立陶宛Fermentas公司产品, *Pyrobest* DNA Polymerase为日本Takara公司产

■ 研发前沿

本文采用SEREX方法, 从高度分化的HCC组织中提取总RNA, 构建cDNA表达文库, 以HCC患者自体 and 异体的混合血清筛选文库, 鉴定HCC表达的肿瘤抗原。

■创新盘点

本实验所筛选出的14个基因片段中, RFC2, NDUFA4, MCART1, Hypothetical protein FLJ25976, hcct-22及hcct-26首次被发现与HCC有关。

品, IPTG为美国Promega公司产品, BCIP/NBT为美国Roche公司产品。寡核苷酸引物合成由上海生工公司及上海博亚生物技术有限公司完成, DNA测序由上海博亚生物技术有限公司及上海华大基因公司完成。

1.2 方法

1.2.1 HCC患者组织cDNA表达文库的构建和筛选 用Trizol方法提取人原发性肝癌组织总RNA并进行mRNA纯化; 反转录合成单链cDNA, 长距离PCR方法合成双链cDNA; PCR产物经蛋白酶K水解、纯化后, 用*Sfi*I酶切; 将酶切产物进行分级分离, 回收0.4 kb以上的cDNA组分, 并与 λ TripEx2载体连接; 连接产物经体外蛋白包装, 产生未扩增文库; 鉴定文库的滴度和重组效率(中华传染病杂志 2005; 23: 289-292)。用大肠杆菌噬菌体裂解液预吸收一抗(HCC患者自体 and 异体混合血清): 在TBST(含5 g/L Tween-20的TBS)缓冲液中按1:10(V/V)稀释大肠杆菌噬菌体裂解液, 将4张硝酸纤维膜依次浸入其中, 在室温下孵育30 min, 30 g/L的BSA封闭, 洗膜; 按1:5在TBST中稀释一抗, 依次硝酸纤维膜放到一抗溶液中, 37℃震荡10 min, 取出硝酸纤维膜, 收集一抗溶液, 加入0.5 g/L NaN_3 放在4℃保存。将噬菌体重组子转染大肠杆菌*XL1-Blue*, 在150 mm LB/MgSO₄琼脂上铺板, 用0.01 mol/L IPTG处理过的硝酸纤维膜诱导蛋白质表达; TBS洗膜后先与1:5000稀释的二抗(碱性磷酸酶-偶联羊抗人抗体)共孵育, 洗膜后与BCIP/NBT进行显色反应, 阳性克隆处用针孔标记; 将滤膜与1:1000稀释的预吸收一抗共孵育, 洗膜后再与二抗共孵育, 显色, 没有针孔标记的阳性噬菌斑为对患者血清反应的阳性克隆; 挑取阳性噬菌斑块, 放置在1×Lambda稀释缓冲液中, 4℃过夜洗脱; 确定洗脱液中噬菌体的滴度, 重复筛选和铺板3次, 直至得到一致的单克隆免疫阳性重组噬菌斑。挑取阳性噬菌斑, 用载体克隆位点两端的通用引物进行PCR扩增, 反应参数为95℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30个循环; 72℃ 7 min。PCR产物纯化后送上海博亚生物技术有限公司及华大基因公司测序, 测序结果在NCBI所提供的网站上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 用BLAST软件同Genbank中的已知基因进行同源性分析。

1.2.2 阳性克隆基因的表达谱检测 为了解我们感兴趣的阳性克隆hcct-19在正常组织和肿瘤组织中的表达情况, 设计hcct-19的特异性引物, 以 β -actin为内参照, 分别从100 mg正常人胃、大

肠、肝脏、胰腺、肾脏、子宫、睾丸及膀胱组织, 100 mg人大肠癌、肾癌、胰腺癌、胃癌、前列腺癌、肝癌、卵巢癌及肺癌组织, 1×10⁶个人肝癌HepG₂细胞、子宫颈癌Hela细胞、胃癌MGC-803细胞、胰腺癌PANC-1细胞、前列腺癌PC3细胞、肺癌W-549细胞及大肠癌SW-480细胞中提取总RNA, RT-PCR法检测hcct-19的表达。hcct-19的上游引物为: 5'-CTATTGGGTGCCATGTTG-3', 下游引物为: 5'-TTCACCTACCCCTCTGACCT-3', 长度为390 bp。β-actin的上游引物为: 5'-CGCCGCGCTCGTCGTCGACA-3', 下游引物为: 5'-GTCACGCACGATTCCCGCT-3', 长度为619 bp。PCR参数为: 95℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, β-actin和hcct-19基因扩增的扩增循环数分别为25个和28个; 72℃ 10 min。取等量hcct-19基因和β-actin基因PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 100 V约30 min, 经数码凝胶成像系统成像, 用Gel Pro analyzer 4.0软件进行条带灰度分析, 以β-actin作为内参照, 测定hcct-19基因的相对表达量。为了解hcct-19在肝癌组织和癌旁组织中的表达是否存在差异, 采用半定量RT-PCR方法, 以β-actin为内参照, 分别检测了20对肝组织和癌旁组织中hcct-19的表达。

统计学处理 数据采用统计软件SPSS 10.0进行t检验。

2 结果

2.1 用SEREX方法鉴定出的HCC抗原基因 我们采用SMART方法构建了HCC的cDNA表达文库, 初始文库容量为1.37×10⁹ pfu/L, 重组克隆百分比为97.46%, cDNA插入片段的平均长度为0.96 kb。选用自体 and 异体HCC患者的混合血清筛选文库, 经过3轮筛选, 得到31个阳性克隆。用载体克隆位点两端的通用引物进行PCR扩增, 产物纯化测序, 所得基因片段的长度324-805 bp不等。测序后的结果经与Genbank进行同源性比较, 得到14个cDNA片段, 其中10个为已知功能基因, 4个为未知功能基因(表1), 这些基因从功能上可分为4类(表2)。在已知功能的基因中, RFC2、NDUFA4及MCART1首次被发现与HCC有关。

2.2 hcct-19的表达谱 以β-actin为内参照(图1), hcct-19目的片段长度为390 bp(图2), PCR产物测序结果和预期相符。hcct-19在部分正常组织(图3)、肿瘤组织(图4)及肿瘤细胞株(图5)中均表达, 但强度较弱。

表 1 SEREX法筛选HCC表达文库所得的基因片段

Clone	Gene	Identity (%)	Accession number	Location	Function
hcct-1, 14	Homo. EIF3S2	99%	U39067	1p34.1	translation initiation factor activity
hcct-3, 6	Homo. RAB4B	98%	NM016154	19q13.2	GTP binding, GTPase activity
hcct-4, 21	Homo. HSPCA	99%	NM005348	14q32.33	Molecule champerone
hcct-5, 8	Homo. IGFBP2	99%	NM000597	2q33-q34	insulin-like growth factor binding
hcct-7	Homo. HSP70	99%	NM004134	5q31.1	Molecule champerone
hcct-9	Homo. MAGE-3	97%	BC005963	Xq28	Unknown
hcct-11, 15	Homo .LDH-A	99%	NM010699	7q	Metabolic enzyme
hcct-12, 16	Homo. MAGE-1	98%	BC017555	Xq28	Unknown
hcct-13	Homo. RFC2	98%	NM181471	7q11.23	nucleotide binding
hcct-18	Homo. hypothetical protein FLJ25976	97%	NM174943	14q24.3	unknown
hcct-19	Homo. MCART1	99%	NM03342	9p13.3-p12	binding
hcct-22	RNA Arabidopsis thaliana ubiquitin activating enzyme	100% (21 bp)	NM121923	5	ubiquitin-like activating enzyme activity, NEDD8 activating enzyme activity
hcct-26	Mus musculus RIKEN cDNA E130307A14 gene	96% (25 bp)	XM211291	10	unknown
hcct-29	Homo. NDUFA4	98%	NM002489	7p21.3	NADH dehydrogenase activity

■应用要点

本文的实验结果有助于更好的理解HCC形成过程中的分子特征,为研究HCC发生、发展的机制提供分子信息,并为HCC的诊断提供了候选标记物。

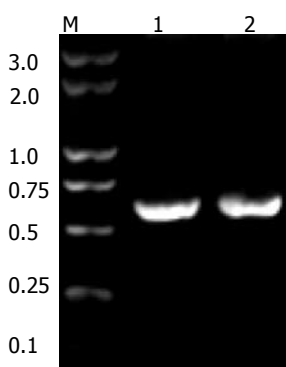


图 1 β -actin的PCR产物电泳图谱. M: DNA标记DLW-3000; 1-2: β -actin.

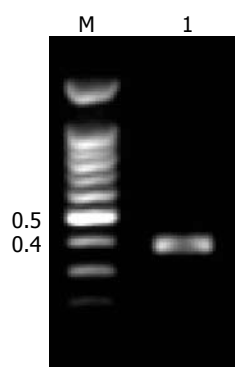


图 2 hcct-19的PCR产物电泳图谱. M: DNA标记SM0321; 1: hcct-19.

2.3 hcct-19在肝癌及癌旁组织中的表达 hcct-19在20例肝癌组织及癌旁组织中均表达,但在肝癌组织中的表达强度高于癌旁组织(图6). PCR产物电泳条带灰度值分析显示,肝癌组hcct-19的相对表达量明显高于癌旁组(13.2 ± 2.7 vs 2.9 ± 0.3 , $P < 0.05$).

3 讨论

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一组具有

高度保守性质的、与细胞耐受应激损伤关系密切的蛋白质^[3],并已经被多个实验证实具有良好的“分子伴侣”和免疫佐剂的效应^[4-6].在肿瘤的发生过程中,HSP可作为肿瘤抗原多肽的靶载体,参与抗原的递呈和加工,可在体内诱导特异性主动免疫.HSPCA(heat shock 90 kDa protein 1 alpha, HSP90 α)在HCC中的表达率明显高于正常肝脏和癌旁组织^[7].对乳腺癌及子宫内膜癌等肿瘤的研究也证实了HSP90 α 呈高表达且与恶性

■同行评价

该研究科学性较强,有一定创新性对该领域研究具有理论参考价值.

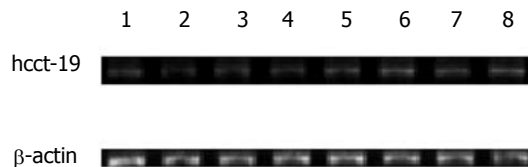


图 3 hcct-19在正常组织中的表达谱. 1: 胃; 2: 大肠; 3: 肝脏; 4: 胰腺; 5: 肾脏; 6: 子宫; 7: 睾丸; 8: 膀胱.

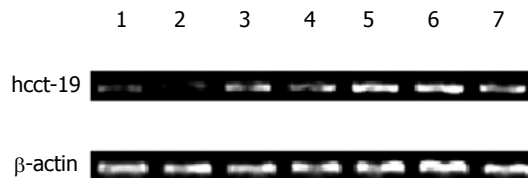


图 5 hcct-19肿瘤细胞株中的表达谱. 1: HepG₂; 2: HeLa; 3: MGC-803; 4: PANC-1; 5: PC3; 6: W-549; 7: SW-480.

表 2 SEREX法筛选出HCC抗原基因的功能分类

功能分类	代表基因
结构基因	HSPCA, HSP70
调节基因	EIF3S2, RAB4B, IGFBP2, RFC2, NM121923
能量代谢基因	LDH-A, NDUFA4, MCART1
未知功能基因	hypothetical protein FLJ25976, XM211291, MAGE-1, MAGE-3

程度相关^[8-10]. 肿瘤细胞中突变或异常蛋白质的存在刺激HSP70的合成,使其呈现持续的高诱导表达. HSP70在肝癌组织中表达,并呈现胞质、胞膜和胞核的表达差异^[11]. 他在肿瘤细胞中异于正常细胞的定位分布,在某种程度上反映了细胞生物学行为的异常,这与肿瘤自身不断增生和无限生长的特性相适应,这种异常的表达分布可能在诱导抗肿瘤免疫中起到作用. 真核翻译起始因子3S2(eukaryotic translation initiation factor 3 p36 subunit, EIF3S2)在蛋白质的生物合成中调节翻译的起始. EIF3S2在62%的HCC组织中过表达,其同家族EIF3S3和EIF3S10被报道在不同的肿瘤中过表达^[12-14]. RAB4B(member RAS oncogene family)在GTP酶介导的信号传导过程及囊泡介导的转运过程中,具有GTP酶的活性. 有学者报道RAB4B在HCC中表达上调^[15]. 胰岛素样生长因子结合蛋白2(insulin-like growth factor binding protein 2.36 kDa, IGFBP2)能抑制细胞的凋亡、起始了整合素介导的黏附信号,肿瘤组织由于产生增多的IGFBP2可以促进肿瘤细胞的增生和侵袭^[16]. 在HCC患者血清中,IGFBP2的水平明显高于正常,甚至部分AFP阴性病例IGFBP2的水平也升高^[17]. 复制因子C2

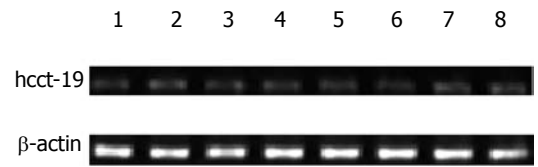


图 4 hcct-19在癌组织中的表达谱. 1: 大肠; 2: 肾; 3: 胰腺; 4: 胃; 5: 前列腺; 6: 肝; 7: 卵巢; 8: 肺.

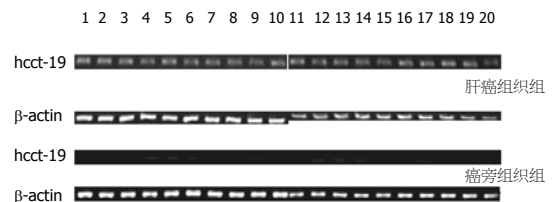


图 6 hcct-19在肝癌及癌旁组织中的表达(半定量RT-PCR).

(replication factor C2, RFC2)在依赖ATP能量反应的条件下使DNA聚合酶捆绑在模板上向前延长DNA合成链. 目前,还认为他与PCNA一起参与细胞DNA损伤后的错配修复和切除修复机制^[18]. 因此,他可以对抗细胞凋亡.

肿瘤细胞繁殖过快,能量消耗剧增,糖酵解增加的结果导致产生过多的乳酸,因此,乳酸脱氢酶-A(lactate dehydrogenase 1, A chain, LDH-A)水平明显升高. 最近发现,LDH-A是一个直接的c-Myc反应基因, c-Myc在持续的转化过程中激活LDH-A来保证能量供应^[19]. 在原发性肝癌,有报道说血清乳酸脱氢酶(serum lactate dehydrogenase, S-LDH)的水平与S-AFP相比,与临床关系更紧密^[20]. NDUFA4(NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex 4)具有NADH脱氢酶和氧化还原酶活性. 将电子从NADH转移至呼吸链,参与能量代谢. MCART1(mitochondrial carrier triple repeat1)是一个线粒体基因,在转运的过程中作为载体具有结合作用,参与能量代谢.

黑色素瘤抗原3(melanoma antigen family, MAGE-3)在多种肿瘤中都有较高程度的表达,可与人类白细胞抗原HLA-A1等结合,被CTL特异识别,产生效应CTL特异杀伤肿瘤细胞^[21-22]. 国外已有人将MAGE-3制备成疫苗,试用于一些肿瘤的临床治疗,取得较好效果^[23-24]. MAGE-3在HCC中阳性率达68%^[25]. 黑色素瘤抗原1(melanoma antigen family, MAGE-1)在HCC中阳性率达67%^[26],但黑色素瘤抗原在肿瘤形成中的具体功能不清. Hypothetical protein FLJ25976为一假想蛋白,功能不明.

本实验所筛选出的14个基因片段中, RFC2、NDUFA4、MCART1、Hypothetical protein FLJ25976、hcct-22及hcct-26首次被发现与HCC有关. hcct-22的长度为520 bp, 其中20 bp与RNA arabidopsis thaliana ubiquitin activating enzyme有86%的同源性. hcct-26的长度为366 bp, 其中25 bp与Mus musculus RIKEN cDNA E130307A14 gene有96%的同源性. 在GenBank人的基因中未找到这2个基因片段的同源基因, 在人的染色体上未找到相对应的位点, 可能是新基因. 未知基因功能尚不清楚, 部分与肿瘤的关系也不明确. 可以推测这些基因与肿瘤的结构、代谢或调控有关, 值得深入研究.

肿瘤的抗原库和他们编码的基因还远不清楚, 既往有学者用SEREX方法从HCC表达文库中筛选出许多核糖体基因、信号转导分子MIF、细胞黏附相关分子Galectin、线粒体基因、分子伴侣及假想蛋白等^[27-29]. 多数是过度表达的结果, 这些基因表达的变化改变了肿瘤细胞的免疫原性, 使其成为B细胞识别的靶抗原. HCC细胞过快的增殖增加了抗原递呈的机会, 从而增加在HCC患者产生针对这些基因的抗体的机会, 免疫系统对之起反应.

hcct-19在HCC组织中的表达强度明显高于癌旁组织. 推测他是一个过量表达的基因. 本实验初步分析了hcct-19在部分组织中的表达谱及在肝癌和癌旁组织中的表达, SEREX方法鉴定的HCC肿瘤抗原正在迅速的累积. 总的说来, 我们的实验结果有助于更好的理解HCC形成过程中的分子特征, 为研究HCC发生、发展的机制提供分子信息, 并为HCC的诊断提供了候选标记物.

4 参考文献

- Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11810-11813
- Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993; 71: 1368-1383
- Mizushima Y, Wang P, Jarrar D, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Preinduction of heat shock proteins protects cardiac and hepatic functions following trauma and hemorrhage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R352-R359
- Manjili MH, Wang XY, Park J, Facciponte JG, Repasky EA, Subjeck JR. Immunotherapy of cancer using heat shock proteins. *Front Biosci* 2002; 7: d43-d52
- Ciupitu AM, Petersson M, Kono K, Charo J, Kiessling R. Immunization with heat shock protein 70 from methylcholanthrene-induced sarcomas induces tumor protection correlating with *in vitro* T cell responses. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 163-170
- Ponomarev ED, Tarasenko TN, Sapozhnikov AM. Splenic cytotoxic cells recognize surface HSP70 on culture-adapted EL-4 mouse lymphoma cells. *Immunol Lett* 2000; 74: 133-139
- 吴胜利, 潘承恩, 牛新捷, 耿智敏, 宫惠琳, 杨威. 原发性肝癌中HSP90 α 的表达及意义. *中华肝胆外科杂志* 2003; 9: 88-90
- Jameel A, Skilton RA, Campbell TA, Chander SK, Coombes RC, Luqmani YA. Clinical and biological significance of HSP89 alpha in human breast cancer. *Int J Cancer* 1992; 50: 409-415
- Mileo AM, Fanuele M, Battaglia F, Scambia G, Benedetti-Panici P, Mancuso S, Ferrini U. Selective over-expression of mRNA coding for 90 KDa stress-protein in human ovarian cancer. *Anticancer Res* 1990; 10: 903-906
- Nanbu K, Konishi I, Komatsu T, Mandai M, Yamamoto S, Kuroda H, Koshiyama M, Mori T. Expression of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. Correlation with clinicopathology, sex steroid receptor status, and p53 protein expression. *Cancer* 1996; 77: 330-338
- 王小平, 刘国贞, 宋爱利, 廖静, 陈瑞芬, 郎振为. 人肝癌组织热休克蛋白70的表达. *首都医科大学学报* 2004; 25: 186-188
- Huang JS, Chao CC, Su TL, Yeh SH, Chen DS, Chen CT, Chen PJ, Jou YS. Diverse cellular transformation capability of overexpressed genes in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315: 950-958
- Nupponen NN, Porkka K, Kakkola L, Tanner M, Persson K, Borg A, Isola J, Visakorpi T. Amplification and overexpression of p40 subunit of eukaryotic translation initiation factor 3 in breast and prostate cancer. *Am J Pathol* 1999; 154: 1777-1783
- Pincheira R, Chen Q, Zhang JT. Identification of a 170-kDa protein over-expressed in lung cancers. *Br J Cancer* 2001; 84: 1520-1527
- He H, Dai F, Yu L, She X, Zhao Y, Jiang J, Chen X, Zhao S. Identification and characterization of nine novel human small GTPases showing variable expressions in liver cancer tissues. *Gene Expr* 2002; 10: 231-242
- 张巍. IGFBP 2和Lip45对胶质瘤侵袭性的调节. *中国微侵袭神经外科杂志* 2004; 9: 478-482
- Ranke MB, Maier KP, Schweizer R, Stadler B, Schleicher S, Elmlinger MW, Flehmig B. Pilot study of elevated levels of insulin-like growth factor-binding protein-2 as indicators of hepatocellular carcinoma. *Horm Res* 2003; 60: 174-180
- Matsumoto Y. Molecular mechanism of PCNA-dependent base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; 68: 129-138
- Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, Jungmann RA, Dalla-Favera R, Dang CV. c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6658-6663
- Fujiwara Y, Takenaka K, Kajiyama K, Maeda T, Gion T, Shirabe K, Shimada M, Sugimachi K. The characteristics of hepatocellular carcinoma with a high level of serum lactic dehydrogenase: a case

- report. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 820-823
- 21 Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J. The immunogenic properties of melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Exp Clin Immunogenet* 1998; 15: 19-32
- 22 Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, Lethe B, Brasseur F, Boon T. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 921-930
- 23 Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 1999; 190: 1669-1678
- 24 Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Burlond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De Greve J, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der Bruggen P, Boon T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 1999; 80: 219-230
- 25 Tahara K, Mori M, Sadanaga N, Sakamoto Y, Kitano S, Makuuchi M. Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 1234-1240
- 26 Kobayashi Y, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Ishizaki M, Kaneyoshi T, Toshikuni N, Kariyama K, Nakayama E, Tsuji T. Expression of MAGE, GAGE and BAGE genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000; 32: 612-617
- 27 Stenner-Liewen F, Luo G, Sahin U, Tureci O, Koslovski M, Kautz I, Liewen H, Pfreundschuh M. Definition of tumor-associated antigens in hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 285-290
- 28 Wang Y, Han KJ, Pang XW, Vaughan HA, Qu W, Dong XY, Peng JR, Zhao HT, Rui JA, Leng XS, Cebon J, Burgess AW, Chen WF. Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol* 2002; 169: 1102-1109
- 29 Uemura M, Nouse K, Kobayashi Y, Tanaka H, Nakamura S, Higashi T, Ono T, Nakayama E, Hanafusa T, Shiratori Y. Identification of the antigens predominantly reacted with serum from patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 2474-2479

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中华消化学会全国第二届炎症性肠病学术会议

本刊讯 中华消化学会全国第二届炎症性肠病学术会议将于2006-06-18/20在广州举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

结构式摘要800字(附软盘), 2006-06-30截稿。

2 联系方式

广州市中山大学一院消化科高翔收(邮编: 510080)。

槲皮素对结肠癌HT-29细胞增殖及周期的影响

严兴耘, 彭俊华, 张华欣, 张峰, 卞晓红, 王海忠, 赵涛

严兴耘, 赵涛, 兰州石油化工公司兰炼医院消化内科 甘肃省兰州市 730060

彭俊华, 张华欣, 张峰, 兰州军医兰州总医院检验科 甘肃省兰州市 730050

卞晓红, 兰州军医兰州总医院消化科 甘肃省兰州市 730050

王海忠, 兰州军医兰州总医院肿瘤科 甘肃省兰州市 730050

严兴耘, 1990年重庆市第三军医大学学士, 主治医师, 主要从事消化系统与肿瘤研究。

通讯作者: 彭俊华, 730050, 甘肃省兰州市, 兰州军医兰州总医院检验科, junhua_p@sohu.com

电话: 0931-8975629

收稿日期: 2005-12-29 接受日期: 2006-01-13

Effects of quercetin on proliferation and cell cycle of colon carcinoma cell Line HT-29

Xin-Yun Yan, Jun-Hua Peng, Hua-Xin Zhang, Feng Zhang, Xiao-Hong Bian, Hai-Zhong Wang, Tao Zhao

Xin-Yun Yan, Zhao Tao, Department of Gastroenterology, Lanlian Hospital, Lanzhou Petrochemical Industry Corporation, Lanzhou 730060, Gansu Province, China

Jun-Hua Peng, Hua-Xin Zhang, Feng-Zhang, Department of Clinical Laboratory, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Xiao-Hong Bian, Department of Digestive Diseases, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Hai-Zhong Wang, Tumor Department of Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Correspondence to: Jun-Hua Peng, Department of Clinical Laboratory, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China. junhua_p@sohu.com

Received: 2005-12-29 Accepted: 2006-01-13

Abstract

AIM: To investigate the effect of quercetin on the proliferation and apoptosis of colon carcinoma cell line HT-29 and its molecular mechanism.

METHODS: HT-29 cells were treated with different concentrations of quercetin (40×10^{-6} , 80×10^{-6} and 160×10^{-6} mol/L) for 72 h. HT-29 cells treated with DMSO vehicle were used as the controls. MTT assay, flow cytometry, immunocytochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to observe the changes of cell proliferation, cell cycle,

Caspase-3 protein expression, and *bax*, *bcl-2*, and Caspase mRNA expression in HT-29 cells, respectively.

RESULTS: Quercetin at a concentration of 40×10^{-6} mol/L promoted the proliferation of HT-29 cells ($P < 0.05$), while it significantly inhibited the proliferation of HT-29 cells at the concentrations of 80×10^{-6} and 160×10^{-6} mol/L ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), showing a time-dependent manner. After treatment with 40×10^{-6} , 80×10^{-6} and 160×10^{-6} mol/L quercetin for 72 h, the proliferation ratio of HT-29 cells were $(111.8 \pm 9.6)\%$, $(64.6 \pm 8.3)\%$ and $(26.1 \pm 5.7)\%$, respectively; the percentages of HT-29 cells at period G_0/G_1 were $(32.7 \pm 5.4)\%$, $(58.1 \pm 18.3)\%$ and $(71.6 \pm 20.8)\%$ respectively, and those of HT-29 cells at period S were $(48.6 \pm 17.5)\%$, $(27.4 \pm 13.4)\%$ and $(15.4 \pm 10.1)\%$, respectively; the apoptosis rates of HT-29 cells were $(7.0 \pm 1.3)\%$, $(15.6 \pm 3.6)\%$ and $(26.4 \pm 6.2)\%$ respectively. 80×10^{-6} , 160×10^{-6} mol/L quercetin acted on HT-29 cell, the cells at period G_0/G_1 and the apoptosis rates were significantly increased ($P < 0.01$), and the cells at period S were significantly decreased ($P < 0.01$) after 80×10^{-6} and 160×10^{-6} mol/L quercetin treatment. Quercetin at concentrations of 80×10^{-6} and 160×10^{-6} mol/L increased the expression of Caspase-3 and *bax* mRNA and Caspase-3 protein, but decreased the expression of *bcl-2* mRNA. Quercetin at a concentration of 40×10^{-6} mol/L increased Caspase-3 mRNA expression and the proliferation of HT-29 cells, but not Caspase-3 protein expression.

CONCLUSION: Quercetin at lower concentrations can promote the proliferation of colon carcinoma cell line HT-29 while it can inhibit the proliferation and induce apoptosis of HT-29 cells at higher concentrations. The mechanism may be associated with up-regulation of Caspase-3 and *bax* and down-regulation of *bcl-2* expression.

Key Words: Apoptosis; Colon cancer; Quercetin; Caspase-3; *bcl-2*; *bax*

Yan XY, Peng JH, Zhang HX, Zhang F, Bian XH, Wang HZ, Zhao T. Effects of quercetin on proliferation and cell cycle of colon carcinoma cell Line HT-29. Shijie Huaren

■背景资料

高浓度Qu能抑制多种肿瘤细胞的增生, 通过影响Caspase-3, *bcl-2*, *bax*, EGFR等mRNA及其蛋白的表达从而诱导多种肿瘤细胞凋亡。Qu能促进结肠癌HT-29细胞凋亡, 其分子机制不十分清楚。

■创新盘点

本文观察了Qu对HT-29细胞增生、凋亡的影响,特别是观察了Caspase-3, *bcl-2*, *bax* mRNA及其蛋白的表达的改变,从凋亡转录水平探讨Qu影响细胞凋亡的可能分子机制。

Xiaohua Zazhi 2006;14(11):1071-1076

摘要

目的: 探讨槲皮素(Qu)对结肠癌HT-29细胞增殖和凋亡影响的分子机制。

方法: 以 40×10^{-6} , 80×10^{-6} , 160×10^{-6} mol/L的槲皮素作用结肠癌HT-29细胞,以溶剂为对照组,采用MTT试验、流式细胞分析、免疫细胞化学和RT-PCR等方法观察槲皮素对结肠癌细胞增殖,细胞周期,细胞凋亡,及Caspase-3蛋白表达、Caspase-3、*bcl-2*、*bax* mRNA表达的影响。

结果: 40×10^{-6} mol/L Qu明显促进HT-29细胞增殖($P < 0.05$), 80×10^{-6} , 160×10^{-6} mol/L Qu明显抑制细胞增殖($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),呈时间-效应。 40×10^{-6} , 80×10^{-6} , 160×10^{-6} mol/L槲皮素作用HT-29细胞72 h,其增殖率分别为 $(111.8 \pm 9.6)\%$, $(64.6 \pm 8.3)\%$ 和 $(26.1 \pm 5.7)\%$, G_0/G_1 期细胞分别为 $(32.7 \pm 5.4)\%$, $(58.1 \pm 18.3)\%$ 和 $(71.6 \pm 20.8)\%$, S期细胞分别为 $(48.6 \pm 17.5)\%$, $(27.4 \pm 13.4)\%$ 和 $(15.4 \pm 10.1)\%$,细胞凋亡率分别为 $(7.0 \pm 1.3)\%$, $(15.6 \pm 3.6)\%$ 和 $(26.4 \pm 6.2)\%$, 80×10^{-6} , 160×10^{-6} mol/L能明显提高 G_0/G_1 期细胞($P < 0.01$),明显降低S期细胞($P < 0.01$),细胞凋亡明显增加($P < 0.01$)。 80×10^{-6} , 160×10^{-6} mol/L的Qu增加细胞中*bax* mRNA, Caspase-3 mRNA及其蛋白的表达,降低*bcl-2* mRNA的表达。 40×10^{-6} mol/L的Qu增加Caspase-3 mRNA表达,但其蛋白表达未见明显增加,细胞增殖明显增加。

结论: 槲皮素能促进结肠癌HT-29细胞增殖,也能诱导细胞凋亡,其机制可能是通过上调Caspase-3和*bax*表达,降低*bcl-2*表达来实现的。

关键词: 细胞凋亡; 结肠癌; 槲皮素; Caspase-3; *bcl-2*; *bax*

严兴耘, 彭俊华, 张华欣, 张峰, 卞晓红, 王海忠, 赵涛. 槲皮素对结肠癌HT-29细胞增殖及周期的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1071-1076

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1071.asp>

0 引言

槲皮素(quercetin, Qu)是一种天然的黄酮类化合物,广泛存在于苹果、洋葱、茶叶^[1-2]及银杏、款冬花、高良姜、侧柏叶、桑寄生、田基黄等中药中,能诱导多种癌细胞凋亡^[3-6],抑制肝肿瘤细胞生长^[7],能促进结肠癌HT-29细胞凋亡^[8-9],但

其作用分子机制未见报道。我们将槲皮素作用于结肠癌HT-29细胞,通过MTT实验、流式细胞仪、免疫组化、RT-PCR等方法观察HT-29细胞的增生、凋亡和Caspase-3, *bcl-2*, *bax*的改变,探讨槲皮素影响HT-29细胞凋亡的可能分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 槲皮素,纯度>98%, Sigma产品。小鼠抗人Caspase-3抗体, 1:75稀释, 羊抗兔S-P试剂盒及DAB显色试剂盒, 北京中杉产品。RT-PCR试剂盒, 上海Sangon产品。人结肠癌HT-29细胞由中科院上海细胞所提供, HT-29细胞在RPMI 1640中37℃, 50 mL/L CO₂培养, 常规传代。

1.2 方法 实验分为4组: Con(对照组), 给予DMSO; Qu40组, 40×10^{-6} mol/L的Qu; Qu80组, 80×10^{-6} mol/L的Qu; Qu160组, 160×10^{-6} mol/L的Qu。

1.2.1 MTT试验 参见文献[10], 以492 nm波长测定活细胞的吸光度(A), 增生率(PR) = 实验组A值/溶剂对照组A值 $\times 100\%$ 。

1.2.2 细胞周期相及凋亡检测 实验各组细胞处理72 h, 收获细胞, 700 mL/L冷乙醇固定, RNase消化, 碘化丙啶(PI)染色, 流式细胞仪检测。

1.2.3 Caspase-3的蛋白检测 细胞生长于小盖玻片上, 多聚甲醛固定, 血清封闭, 加一抗于37℃孵育50 min, 按SABC试剂盒操作, DAB显色, 脱水、透明, 显微镜观察并照相及数据分析。

1.2.4 RT-PCR检测Caspase-3、*bax*、*bcl-2* mRNA 实验各组细胞处理72 h, 收获细胞, 用Turipure试剂一步法提取各组细胞总RNA, 逆转录为cDNA置-80℃备用。引物由上海生工生物公司合成, Caspase-3: 上游5'-CAA ACT TTT TCA GAG GGG ATC G -3', 下游5'-GCA TAC TGT TTC AGC ATG GCA C -3', 扩增产物272 bp; *bcl-2*: 上游5'-TGT GGC CTT CTT TGA GTT CG-3', 下游5'-TCA CTT GTG GCT CAG ATA A GC -3', 扩增产物280 bp; *bax*: 上游5'-TCC ACC AAG AAG CTG AGC GA -3', 下游5'-GTC CAG CCC ATG ATG GTT CT -3', 扩增产物257 bp; β -actin: 上游5'-ATC CAT CCG ACA TTG AAG T-3', 下游5'-CTC TAA GTT GCC AGC CCT-3', 扩增产物449 bp。取样本总cDNA 3 μ L、上游和下游引物各1.5 μ L, 依次加入试剂盒其他成分。反应条件: 94℃灭活40 s, 60℃退火40 s, 72℃延伸40 s, 22个循环, 20 g/L琼脂糖电泳, 照相、分析。

统计学处理 采用SPSS 10.0软件进行单因素

表 1 槲皮素对HT-29结肠癌细胞增殖的影响 (4, mean \pm SD)

t/h	Control	C(Quercetin)/(μ mol/L)		
		40	80	160
24	0.454 \pm 0.013	0.499 \pm 0.016	0.351 \pm 0.011 ^a	0.183 \pm 0.011 ^b
48	0.662 \pm 0.036	0.772 \pm 0.046 ^a	0.458 \pm 0.023 ^b	0.221 \pm 0.012 ^b
72	0.874 \pm 0.035	0.977 \pm 0.036 ^a	0.565 \pm 0.028 ^b	0.227 \pm 0.011 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs Control.表 2 槲皮素作用48 h对HT-29细胞周期的影响 (mean \pm SD, $n = 3$, %)

分组	G ₁ /G ₀	G ₂ /M	S	凋亡
Control	27.54 \pm 11.25	19.98 \pm 8.71	52.48 \pm 16.75	4.65 \pm 1.13
Qu40	32.72 \pm 15.42	18.69 \pm 9.61	48.59 \pm 17.54	6.97 \pm 1.25
Qu80	58.05 \pm 18.34 ^b	14.57 \pm 7.48	27.38 \pm 13.41 ^b	15.55 \pm 3.57 ^b
Qu160	71.58 \pm 20.76 ^b	13.06 \pm 5.37	15.36 \pm 10.06 ^b	26.41 \pm 6.19 ^b

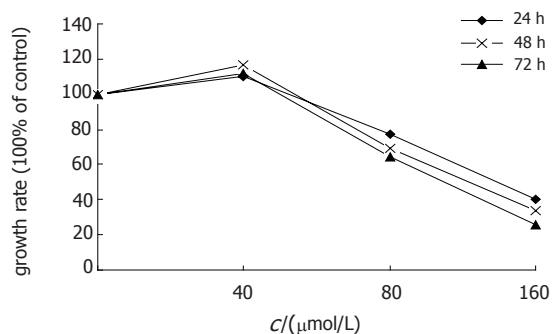
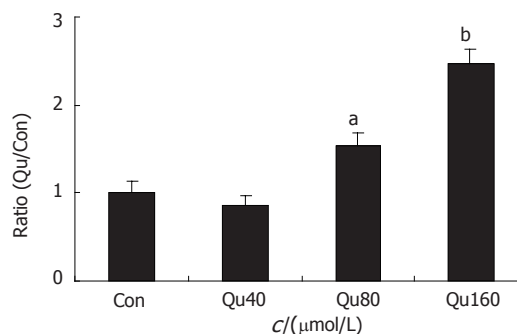
^b $P < 0.01$ vs Control.

图 1 槲皮素对HT-29细胞增殖率的影响.

图 2 槲皮素作用48 h对HT-29细胞中Caspase-3蛋白表达的影响. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs Control.

方差分析.

2 结果

2.1 槲皮素对HT-29细胞增生的影响 40×10^{-6} mol/L的Qu能促进HT-29细胞增生; 80×10^{-6} mol/L的Qu能抑制细胞增生; 160×10^{-6} mol/L的Qu对细胞增生的抑制作用更明显(表1). 40×10^{-6} , 80×10^{-6} , 160×10^{-6} mol/L的Qu作用72 h, HT-29细胞的增生率分别为111.8%, 64.6%, 26.0%, 80×10^{-6} , 160×10^{-6} mol/L Qu抑制HT-29细胞增生呈现时间-效应关系(图1).

2.2 槲皮素对HT-29细胞周期的影响 流式细胞分析结果显示, Qu作用HT-29后, 40×10^{-6} mol/L Qu对HT-29结肠癌的细胞周期影响不大, 但 80×10^{-6} 和 160×10^{-6} mol/L Qu主要将HT-29结肠癌细胞阻滞于G₀/G₁期, 并且细胞凋亡明显增加(表2).

2.3 槲皮素对HT-29细胞Caspase-3蛋白表达的影响 80×10^{-6} 和 160×10^{-6} mol/L Qu能促进HT-29

结肠癌细胞中Caspase-3蛋白表达, 并呈剂量-效应关系, 但 40×10^{-6} mol/L对HT-29结肠癌细胞中Caspase-3蛋白表达影响不大(图2, 3).

2.4 槲皮素对HT-29细胞Caspase-3, *bcl-2*, *bax* mRNA表达的影响 40×10^{-6} mol/L槲皮素能降低HT-29细胞Caspase-3的表达, 但 80×10^{-6} , 160×10^{-6} mol/L槲皮素能激活细胞中Caspase-3和*bax* mRNA表达, 并呈剂量-效应关系(图4A, B).

RT-PCR的半定量分析以凝胶成像系统的分析软件Q1来分析其灰度值, 每实验重复3次, 设Control组目的条带/ β -actin为I₀, Qu组的目的条带/ β -actin值为I, 以I/I₀值为半定量结果, 各组间进行单因素方差分析, 结果显示, 40×10^{-6} mol/L槲皮素能明显降低HT-29细胞中Caspase-3的表达, 但 80×10^{-6} mol/L和 160×10^{-6} mol/L槲皮素能明显激活细胞中Caspase-3和*bax* mRNA表达, 明显降低*bcl-2*的表达, 并呈剂量-效应关系(图5).

应用要点

应进一步从体内证实Qu对结肠癌增生和凋亡的影响, 为含Qu的食物或药物防治结肠癌提供充足的理论依据.

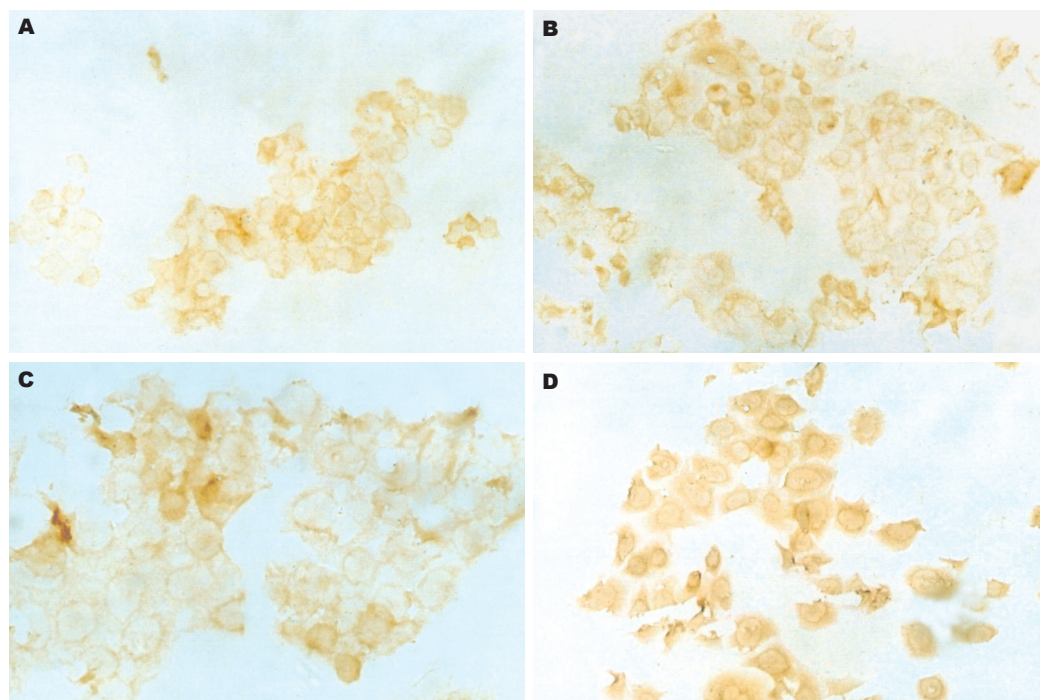


图3 槲皮素对HT-29细胞中Caspase-3蛋白表达的影响 (SABC × 400). A: Control; B: Qu40; C: Qu80; D: Qu160.

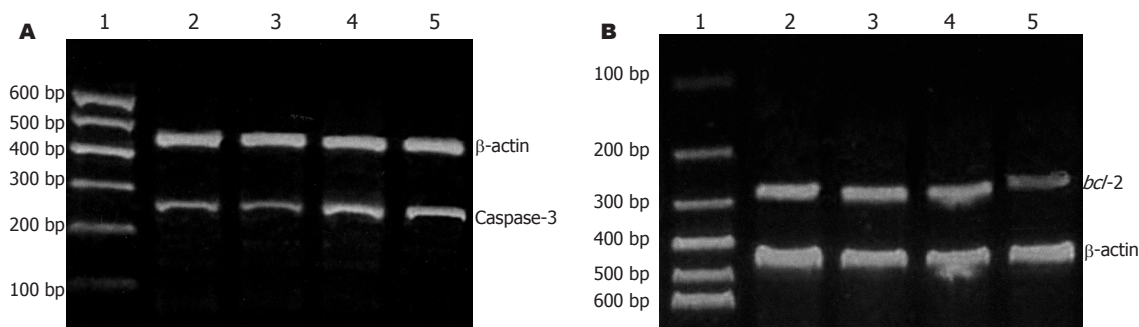


图4 槲皮素对结肠癌HT-29细胞Caspase-3, *bcl-2* mRNA的表达的影响. A: Caspase-3; B: *bcl-2*. 1: Marker; 2: Control; 3: Qu40; 4: Qu80; 5: Qu160.

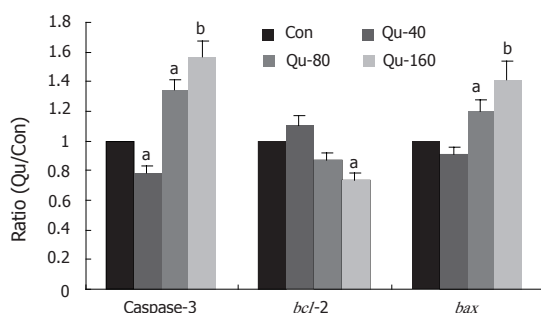


图5 槲皮素对HT-29细胞Caspase-3、*bcl-2*和*bax* mRNA表达的定量分析. ^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs Con.

3 讨论

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤,发病年龄多见于40-70岁,其发病率在我国仅次于胃癌和食管癌.结肠癌发病率在北美、西欧较高,美国结肠癌占全部癌死亡原因的第二位.近年来的调查结果显示,结肠癌的患者逐渐增多,尤其是城

市患者数量迅速上升,因此,研究结肠癌的防治具有非常重要的实用价值.槲皮素是广泛存在于水果、蔬菜、种子、核桃、茶和红酒中的一种天然黄酮类化合物,具有雌激素效应^[1-2,11-13].研究表明Qu能诱导肺腺癌A549^[4,14]、白血病K562细胞及HL-60细胞凋亡^[2,15],抑制肺癌A549、乳腺癌MCF-7增生^[9,14],有逆转胃癌多药耐药性的效应^[16],Qu通过下调HT-29细胞中MMP-7前蛋白的表达降低肿瘤的转移和侵袭活力^[17],也通过下调EGFR和cyclinD1的表达影响细胞增生的信号传导,抑制细胞的增生^[18-19].但也有不同报道,Qu对HT-29细胞的增生表现出双向性,低浓度($<70 \times 10^{-6}$ mol/L)时能促进结肠癌HT-29和乳腺癌MCF-7细胞增生,但高浓度($>80 \times 10^{-6}$ mol/L)却抑制HT-29和MCF-7细胞的增生^[9].

细胞增生依赖于细胞周期的顺利进行,该过程受G₁/S、G₂/M两个关键点调控.本结果显

示, 40×10^{-6} mol/L的Qu能促进HT-29细胞的增生, 但Qu对细胞周期相和细胞凋亡的影响均不大. 低浓度的槲皮素能促进HT-29结肠癌细胞增生^[1], 可能与其具有弱雌激素活性相关, 因为低浓度的槲皮素、三羟异黄酮能促进乳腺癌MCF-7细胞的增生^[12], 而且进食富含黄酮类化合物的大豆食品具有促乙状结肠细胞增生作用^[20]. 80×10^{-6} mol/L和 160×10^{-6} mol/L的Qu则抑制HT-29的增生, 细胞阻滞于G₀/G₁期, 且结肠癌HT-29细胞出现明显的亚G₀/G₁峰(凋亡峰), 细胞凋亡明显增加, 这些结果与槲皮素联合阿霉素作用MCF-7移植瘤将细胞阻滞于G₁/S节点, 最终抑制移植瘤细胞增生相一致^[21]. 但与Qu作用肺癌NCI-H209细胞及前列腺癌PC-3细胞, 将细胞阻滞于G₂/M节点不同, 这可能与采用的细胞株不同有关^[22-23]. 高浓度的槲皮素、三羟异黄酮能抑制乳腺癌MCF-7细胞的增生^[9]. 上述结果表明槲皮素对HT-29结肠癌细胞作用具有双向性.

肿瘤的生长是由于细胞的增生和凋亡失衡而造成的, Qu能通过影响结肠癌细胞中调控细胞生长、分化和凋亡过程中的多种基因和蛋白的表达, 调节肿瘤的发生和发展. *bcl-2*和*bax*属于*bcl-2*家族, 共同调控细胞的凋亡过程, 其中*bcl-2*为抗凋亡基因, *bax*为促凋亡基因. Caspase-3是介导细胞凋亡过程最早出现改变的一类蛋白水解酶, 是细胞凋亡执行的重要效应因子, 其量增加会促进细胞凋亡. 当细胞中*bax*表达增高、*bcl-2*表达降低, 导致Caspase-3表达增加, 细胞凋亡增加. 结肠癌中Caspase-3, *bcl-2*和*bax*均呈高表达, 其增加表达与组织分级相关. 研究报道茶多酚和茶色素通过明显抑制人肝癌HepG₂细胞中*bcl-2*表达, 诱导*bax*表达, 促进细胞凋亡^[24]. 中药复方剂肠复康通过提高移植瘤中Caspase-3的表达和*bax/bcl-2*表达比值, 诱导人结肠癌HT-29裸鼠移植瘤细胞的凋亡^[25]. Quercetin通过诱导白血病K562细胞使细胞呈现出明显的核固缩、核凝集等细胞凋亡形态学改变, Caspase-3酶活性明显升高, 最终导致细胞凋亡增加^[4]. Qu通过下调*bcl-2*、*bcl-x*的表达, 上调*bax*和Caspase-3的表达, 增加肺癌NCI-H209细胞及前列腺癌PC-3细胞的凋亡^[22-23]. 本结果显示 80×10^{-6} mol/L和 160×10^{-6} mol/L的Qu通过明显增加HT-29细胞中*bax* mRNA的表达, 降低*bcl-2* mRNA的表达, 激活结肠癌HT-29细胞中Caspase-3 mRNA和蛋白的表达, 诱导细胞凋亡明显增加, 最终表现出抗肿瘤效应. 40×10^{-6} mol/L的Qu虽然能增加

Caspase-3 mRNA的表达, 但其蛋白的表达未见明显增加, 最终导致HT-29细胞凋亡改变不明显, 这与Qu能降低HT-29细胞中*bcl-2*表达, 增加细胞中Caspase-3蛋白表达水平相一致^[26]. *bax* mRNA表达增加, 但Bax蛋白表达并没有明显改变, 这可能是由于Qu对HT-29细胞中*bax*的转录水平影响较大, 而对Bax蛋白的翻译过程影响不大.

总之, 80×10^{-6} 和 160×10^{-6} mol/L的Qu能明显增加*bax* mRNA的表达, 降低*bcl-2* mRNA的表达, 激活Caspase-3 mRNA和蛋白的表达, 细胞阻滞于G₀/G₁, 最终抑制癌HT-29细胞的增生, 细胞凋亡增加, 表现出抗肿瘤效应. 40×10^{-6} mol/L的Qu能促进HT-29细胞的增生, 其机制是否与槲皮素的雌激素活性相关, 有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Wenzel U, Herzog A, Kuntz S, Daniel H. Protein expression profiling identifies molecular targets of quercetin as a major dietary flavonoid in human colon cancer cells. *Proteomics* 2004; 4: 2160-2174
- 2 Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc* 2002; 102: 1414-1420
- 3 于利人, 张东昌, 王瑞珉, 靳秋月, 陈立军. 槲皮素诱导K562细胞凋亡机制探讨. *中国肿瘤临床* 2005; 32: 505-507
- 4 罗进勇, 李林, 尹一兵. 槲皮素对人肺腺癌A549细胞增生和凋亡的影响. *重庆医学* 2005; 34: 551-552
- 5 刘明学, 吴凯南, 赵小波. 槲皮素联合奥曲肽对人乳腺癌细胞株MDA-MB-231增生的影响. *中国肿瘤临床* 2005; 32: 404-406
- 6 Pawlikowska-Pawlega B, Jakubowicz-Gil J, Rzymowska J, Gawron A. The effect of quercetin on apoptosis and necrosis induction in human colon adenocarcinoma cell line LS180. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; 39: 217-218
- 7 王朝杰, 管小琴, 杨炼, 汤为学, 廖小岗. 槲皮素对肝肿瘤细胞生长周期的影响. *中国新药与临床杂志* 2004; 23: 695-698
- 8 Chen YC, Shen SC, Chow JM, Ko CH, Tseng SW. Flavone inhibition of tumor growth via apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Int J Oncol* 2004; 25: 661-670
- 9 van der Woude H, Gliszczynska-Swiglo A, Struijs K, Smeets A, Alink GM, Rietjens IM. Biphasic modulation of cell proliferation by quercetin at concentrations physiologically relevant in humans. *Cancer Lett* 2003; 200: 41-47
- 10 王斌, 糜漫天, 彭俊华, 朱俊东. 辛基酚和三羟异黄酮对大鼠乳腺癌发生及细胞增生影响的研究. *第三军医大学学报* 2005; 27: 119-122
- 11 Leung LK, Po LS, Lau TY, Yuen YM. Effect of dietary flavonols on oestrogen receptor transactivation and cell death induction. *Br J Nutr* 2004; 91: 831-839
- 12 van der Woude H, Ter Veld MG, Jacobs N, van der Saag PT, Murk AJ, Rietjens IM. The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 763-771
- 13 Virgili F, Acconcia F, Ambra R, Rinna A, Totta P,

- Marino M. Nutritional flavonoids modulate estrogen receptor alpha signaling. *IUBMB Life* 2004; 56: 145-151
- 14 Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. *Carcinogenesis* 2004; 25: 647-659
- 15 Shen SC, Chen YC, Hsu FL, Lee WR. Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the Caspase 3 cascade. *J Cell Biochem* 2003; 89: 1044-1055
- 16 余生元, 董晓强, 黄世良, 陈惠康, 袁晓东, 李涛. 槲皮素对胃癌细胞多药耐药的逆转作用. *江苏医药* 2004; 30: 510-512
- 17 Kawabata K, Murakami A, Ohigashi H. Nobletin, a citrus flavonoid, down-regulates matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) expression in HT-29 human colorectal cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 307-314
- 18 Kern M, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, Dietrich H, Pahlke G, Marko D. Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 317-328
- 19 Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, Sakuragi N, Fujimoto S, Dahiya R. Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1. *Int J Oncol* 2003; 22: 159-164
- 20 Adams MR, Golden DL, Williams JK, Franke AA, Register TC, Kaplan JR. Soy protein containing isoflavones reduces the size of atherosclerotic plaques without affecting coronary artery reactivity in adult male monkeys. *J Nutr* 2005; 135: 2852-2856
- 21 吴凯南, 马双慰. 槲皮素对人乳腺癌裸鼠移植瘤细胞周期的影响. *肿瘤防治研究* 2003; 30: 6-8
- 22 Yang JH, Hsia TC, Kuo HM, Chao PD, Chou CC, Wei YH, Chung JG. Inhibition of lung cancer cell growth by quercetin glucuronides via G₂/M arrest and induction of apoptosis. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 296-304
- 23 Vijayababu MR, Kanagaraj P, Arunkumar A, Ilan-govan R, Aruldas MM, Arunakaran J. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in prostatic carcinoma cells (PC-3) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression. *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131: 765-771
- 24 贾旭东, 韩驰, 陈君石. 茶多酚和茶色素对人肝癌细胞株HepG₂细胞凋亡的影响. *卫生研究* 2005; 34: 73-75
- 25 熊绍权, 琚国胜, 王柏丁, 刘碧清. 肠复康对人大肠癌HT-29细胞凋亡的影响. *中医杂志* 2005; 46: 52-54
- 26 Kim WK, Bang MH, Kim ES, Kang NE, Jung KC, Cho HJ, Park JH. Quercetin decreases the expression of ErbB2 and ErbB3 proteins in HT-29 human colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 155-162

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第一届北京国际消化内镜高峰论坛

本刊讯 第一届北京国际消化内镜高峰论坛将于2006-06-02/04在北京举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

中英文结构式摘要(800字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-04-30截稿。

2 联系方式

北京东单三条甲七号中华医学会北京分会消化内镜委员会 崔宇星 (100005); 电话010-8511196; E-mail: xhnj1196@yahoo.com.cn.

双歧杆菌定量分析技术研究进展

陈津津, 蔡威

陈津津, 蔡威, 上海交通大学医学院附属新华医院临床营养中心 上海市 200092

陈津津, 2004年上海交通大学医学院博士生, 主治医师, 主要从事胃肠道微生态的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271350

通讯作者: 陈津津, 200092, 上海市控江路1665号, 上海交通大学医学院附属新华医院临床营养中心. jivoo@163.com

电话: 021-65790000

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-21

摘要

传统细菌培养计数法是依据细菌表型特征来对双歧杆菌进行鉴别计数的, MTPY和BSM培养基是经常使用的双歧杆菌培养基. 近年来包括点杂交、荧光原位杂交、荧光原位杂交结合流式细胞计数和荧光实时定量PCR技术在内的以核糖体及其编码基因核酸序列为鉴别基础的分子生物学技术被广泛用于双歧杆菌的定量定性分析, 其中荧光原位杂交结合流式细胞计数和荧光实时定量PCR技术是目前较为理想的方法。

关键词: 双歧杆菌; 定量分析; 计数; 杂交

陈津津, 蔡威. 双歧杆菌定量分析技术研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1077-1080

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1077.asp>

0 引言

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是1899年由法国巴斯德研究所的Tissier首次从母乳喂养的婴儿粪便中分离发现的, 作为恒温动物肠道内重要的原籍菌群, 他与其他生理性细菌成员一起构成了一个微生物群落, 并与宿主构成一个微生态系统, 发挥维持微生态平衡、生物拮抗、免疫调节、营养等多方面的生理作用. 对人类而言, 他不仅能维持肠道的微生态平衡, 还能提高人体对乳糖的耐受性, 具有降血脂、抗肿瘤的作用, 并能合成多种维生素, 促进机体免疫机能, 是最重要的益生菌之一, 其在肠道内的总数量反应了机体肠道微生态状况和机体的健康状况. 因此对肠道内或食品中的双歧杆菌进行准确地定量分析, 对于医疗卫生和营养保健方面的研究

具有重要意义. 双歧杆菌定量分析的方法主要分为传统计数法和分子生物学定量分析法.

1 传统计数法

细菌培养加菌落计数是双歧杆菌定性定量的一种传统计数方法, 主要是依据细菌表型特征通过特殊培养基接种培养、菌株计数而实现. 由于双歧杆菌属于革兰氏阳性厌氧菌, 无孢子形成, 不能游动, 无氧化脱氢酶, 形态多变, 对酸敏感, 对营养要求苛刻, 其生长所需的氮源需有酪蛋白降解产生的肽和氨基酸, 所需的碳源大多由人体不能利用的寡糖提供, 且与其他乳酸菌如嗜酸乳杆菌、德氏乳杆菌、保加利亚乳杆菌及嗜热链球菌具有相近的生长特点, 使双歧杆菌的培养和鉴别存在很大难度.

当待测样品中仅含有双歧杆菌时, 其计数可在葡萄糖血肝培养基(glucose-blood-liver, GBL)、强化梭菌培养基(reinforced clostridial agar, RCA)和脑心浸液培养基(brain-heart infusion, BHI)等培养基中进行^[1]. 然而大多情况下, 待测样品中往往混合了多种细菌, 此时必须利用选择性鉴别培养基来对双歧杆菌进行鉴别计数, 各种细菌不同的氧耐受性、营养要求、抗生素敏感性以及菌落的形态和颜色特征构成了鉴别的基础. 在以往众多的选择性鉴别培养基中, 应用效果较好的主要有: 1978年Teraguchi *et al*^[2]将新霉素-巴龙霉素-萘啶酮酸-氯化锂培养基(neomycin-paromomycin-nalidixic acid-lithium chloride, NPNL)用于双歧杆菌的选择计数, 该培养基在后来双歧杆菌计数培养基的发展中一直作为一种参考培养基. 其后, Lapierre *et al*^[3]设计的氯化锂-丙酸钠培养基(lithium chloride-sodium propionate, LP)及Lim *et al*^[4]研制的葡萄糖-血肝-牛胆汁-庆大霉素培养基(glucose-blood-liver-oxgall-gentamycin, GBL-OG), 在发酵乳制品中选择计数双歧杆菌时也得到较好的结果, 1999年Rhodes *et al*^[5]研究的在半乳糖基质中同时计数双歧杆菌及其他乳酸菌的方法也比较好. 近

■背景资料

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是最重要的益生菌之一, 对肠道内或食品中的双歧杆菌进行准确地定量分析, 对于医疗卫生和营养保健方面的研究具有重要意义. 由于双歧杆菌的传统培养计数法存在培养条件苛刻, 计数不准确, 因此目前应用分子生物学技术对其进行定量分析成为该研究领域的热点. 本文针对目前双歧杆菌定量分析方法进展迅速、方法多样, 但各存利弊、在应用上缺乏统一标准, 故广泛查阅了ISI、PubMed等所收录的近年来检测双歧杆菌的所有相关文献, 对其整理分类后作一综述, 期望有助于相关研究中对双歧杆菌定量方法应用的选择.

■同行评价

双歧杆菌由于参与构成宿主生态系统,发挥维持微生态平衡、免疫调节、营养等多方面的生理作用,其在肠道内的总数量反应了机体肠道微生态状况和机体的健康状况。因此对肠道内或食品中的双歧杆菌进行准确地定量分析,对于医疗卫生和营养保健方面的研究具有重要意义。本文,选题明确,较详细的综述了人类双歧杆菌定量分析方法,所引用的参考文献较新,文章内容有一定的科学参考价值和可读性,基本能反映国内外双歧杆菌定量方法研究动态。

年改良的TPY培养基(modified TPY, MTPY)^[6]和在MRS培养基中添加盐酸半胱氨酸的BSM培养基(bifidobacteria selective medium, BSM)^[7]因对双歧杆菌的选择性较强、培养阳性率较高而经常使用。以上各种培养基主要是用于食品或发酵乳制品中双歧杆菌菌种的培养,如长双歧杆菌(*B. longum*)、短双歧杆菌(*B. breve*)、婴儿双歧杆菌(*B. infantis*)、青春双歧杆菌(*B. adolescentis*)、两双歧杆菌(*B. bifidum*)等,而正常人体还包括了一些不能由这些培养基鉴别计数的双歧杆菌的其他菌种,如球双歧杆菌(*B. globosum*)、链双歧杆菌(*B. catenulatum*)、假链双歧杆菌(*B. pseudocatenulatum*)、角双歧杆菌(*B. angulatum*)等,同时培养基中添加的抗生素对双歧杆菌本身也会有不同程度的抑制作用,而且特异性培养基只是相对特异^[8],到目前为止也没有一种完全理想的选择性培养基。这些原因使得传统的细菌培养法虽然能计数活菌,但费时、费力、培养难度大,其计数也不精确。

2 分子生物学定量分析法

传统细菌培养法的鉴别依据是基于细菌的形态学、生理学和生物化学特征,而这些特征仅仅是细菌在特殊培养条件下的特异表现,相反分子生物学定量分析法是以细菌基因组的核酸序列为鉴别基础,不易受外界环境因素的干扰,不依赖培养基性能,不受培养时间限制,使定量分析结果更稳定、更敏感、更省时,同时重复性更好^[9]。细菌细胞内核糖体数量达104-105,核糖体RNA(rRNA)又具有特异区和保守区之分,因此5S rRNA、16S rRNA和23S rRNA的指纹图谱和序列常被用作比较微生物学分类的方法。其中16S rRNA的序列达1500-12 000个核苷酸,其序列长度适中,兼有保守区和可变区之分,因此其序列资料常用于设计基因探针和PCR(多聚酶链反应)扩增引物。由于探针和引物具有高度敏感性和特异性,使其能在属、种、亚种甚至株等各个水平上对细菌进行鉴别计数。目前用于双歧杆菌定量分析的分子生物学技术主要有点杂交(dot blot hybridization)、荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、荧光原位杂交结合流式细胞计数(FISH combined with flow cytometry)和荧光实时定量PCR技术(real-time quantitative PCR, real-time Q-PCR)。

2.1 点杂交(dot blot hybridization) 进入1990年代

后,以16S rRNA为目标基因的寡核苷酸探针杂交技术被广泛用于细菌的定性定量分析^[10]。该技术由两部分组成。(1)合成的寡核苷酸探针能与细菌核糖体基因的特殊区域互补杂交,使其具有鉴别的特异性;(2)探针末端用特殊物质进行标记,这些标记物又可分为具有放射活性的热标,如^[32P]ATP、异硫氰酸荧光素(FITC)等,和不具放射活性的冷标,如共价键结合的报告酶或通过间接标记的半抗原抗体等,然后通过特定设备对标记物产生的放射活性、荧光数值、酶活性或比色反应数值的测定来实现定量的目的^[11]。点杂交和荧光原位杂交是主要的两种用于双歧杆菌定量分析的寡核苷酸探针杂交技术。

Seksik *et al*^[12]用6种不同细菌属的以16S rRNA为目标基因的特异寡核苷酸探针,同时与克隆病患者粪便中和正常人粪便中提取的RNA进行点杂交,发现克隆病患者肠道内的双歧杆菌和梭菌数量、活性较正常人组明显下降。同样的技术也应用于年龄、疾病与相关肠道菌群结构变化的研究^[13]中,研究指出随年龄的增长,肠道内双歧杆菌的数量、所占比例明显下降,同时罹患疾病的风险显著增加。Dore *et al*^[14]、Sghir *et al*^[15]和Marteau *et al*^[16]在各自的研究中也用点杂交技术对双歧杆菌进行了定量。点杂交技术是以细胞内杂交的rRNA量来反应细菌数量,其优点在于rRNA数量能反应细胞的生理活性,然而不同的细菌细胞内或同一细菌不同生长期细胞内所含的rRNA数量有变异,所以用以16S rRNA为目标基因的点杂交进行细菌定量只是一种相对定量,其结果具有局限性。针对上述缺点,目前以rDNA即编码16S rRNA的基因序列为目标基因的点杂交技术在计数双歧杆菌时,避免了核糖体数量变异的影响,取得了较好的效果^[17]。

2.2 荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 与点杂交、反斑点杂交和克隆杂交等杂交技术不同,荧光原位杂交虽然也是以16S rRNA为目标基因,但其无需提取RNA,而是在待测样品中直接加入荧光探针,其荧光显像是一个细胞、一个细胞为基础,从而可在荧光显微镜下对原位细胞内的rRNA量和代谢活性有直观了解,并在荧光显微镜下进行细菌计数。1995年Langendijk *et al*^[18]首次报道了用荧光原位杂交法测定成人肠道细菌数量,发现双歧杆菌数量只占细菌总量的2%,远较以往10%的结论

要低. 其后由于荧光原位杂交操作方法简易、定量精确和检测敏感特异, 而被广泛用于乳制品^[19]和肠道中^[20-24]包括双歧杆菌在内的各种细菌的定量检测.

2.3 荧光原位杂交结合流式细胞计数(FISH combined with flow cytometry) 由于荧光显微镜下的细菌计数耗时较长, 目前又出现了以荧光原位杂交结合流式细胞计数的方法对双歧杆菌进行快速、自动的计数. 由于该方法结合了FISH的简易、直观和流式细胞仪计数快捷的优点, 使他在近几年内成为医学研究实践中常用的方法之一. 2004年一项抗生素对肠道菌群影响的实验室研究^[25]和同年Fergus *et al*^[26]在炎症肠病的研究中都采用了此法对双歧杆菌进行定量分析, 取得了较理想的结果. 在应用益生菌治疗肠道感染的一项研究中^[27]也提示了相同的结论.

2.4 荧光实时定量PCR技术(real-time quantitative PCR, real-time Q-PCR) 多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的出现虽然只有20 a, 但他及其衍生技术已成为分子生物学实验研究最重要的手段之一. 在近几年对双歧杆菌的各种研究中已涉及PCR、多重PCR(multiplex PCR)、扩增核糖体DNA限制性分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和荧光实时定量PCR(real-time Q-PCR)等多种PCR技术. 其中real-time Q-PCR是指在PCR反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号累积实时监测整个PCR进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法. 他实现了PCR从定性到定量的飞跃, 并以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点成为双歧杆菌定量分析的重要方法. 2004年Gueimonde *et al*^[28]在测定不同年龄正常人粪便中双歧杆菌的数量时, 分别使用了real-time Q-PCR和FISH两种技术, 结果发现两者在双歧杆菌高浓度水平时都能进行精确定量, 且结果具有良好的相关性, 而在低浓度水平时, real-time Q-PCR的测定更敏感也更精确, 其最低检测水平可达 $5 \times 10^4/\text{g}$. 在比较real-time Q-PCR和点杂交定量粪便细菌的研究^[17]中发现, real-time Q-PCR的敏感性远高于点杂交, 且操作更简易, 更快速. Haarman *et al*^[29]用real-time Q-PCR方法进行的研究发现, 食用添加益生源配方奶粉的婴儿, 其肠道内双歧杆菌的总量较食用标准

配方奶粉的婴儿明显升高, 且双歧杆菌的菌种构成也与母乳喂养的婴儿相仿. Bartosch *et al*^[30]在对老年人肠道菌群结构变化的研究中也使用了real-time Q-PCR定量技术, 发现双歧杆菌等益生菌数量与年龄、饮食和抗生素治疗密切相关.

总之, 从传统细菌培养法到利用分子生物学技术进行定量分析, 整个定量分析技术逐渐向高精度度、高敏感度、高重复性和高效率发展.

3 参考文献

- 1 Dave RI, Shah NP. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *bifidobacteria*. *J Dairy Sci* 1996; 79: 1529-1536
- 2 Teraguchi S, Uehara M, Ogasa K, Mitsuoka T. Enumeration of *bifidobacteria* in dairy products (author's transl). *Nippon Saikingaku Zasshi* 1978; 33: 753-761
- 3 Lapierre L, Undeland P, Cox LJ. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of *bifidobacteria* in fermented dairy products. *J Dairy Sci* 1992; 75: 1192-1196
- 4 Lim KS, Huh CS, Baek YJ, Kim HU. A selective enumeration medium for *bifidobacteria* in fermented dairy products. *J Dairy Sci* 1995; 78: 2108-2112
- 5 Rhodes MW, Kator H. Sorbitol-fermenting *bifidobacteria* as indicators of diffuse human faecal pollution in estuarine watersheds. *J Appl Microbiol* 1999; 87: 528-535
- 6 Rada V, Petr J. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting *bifidobacteria* from hen caeca. *J Microbiol Methods* 2000; 43: 127-132
- 7 Leuschner RG, Bew J, Simpson P, Ross PR, Stanton C. A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic *bifidobacteria* in animal feed. *Int J Food Microbiol* 2003; 83: 161-170
- 8 Wilson KH, Blitchington RB. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2273-2278
- 9 Nissen H, Dainty R. Comparison of the use of rRNA probes and conventional methods in identifying strains of *Lactobacillus sake* and *L. curvatus* isolated from meat. *Int J Food Microbiol* 1995; 25: 311-315
- 10 Tannock GW. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999; 76: 265-278
- 11 Dattagupta N, Rae PM, Huguenel ED, Carlson E, Lyga A, Shapiro JA, Albarella JP. Rapid identification of microorganisms by nucleic acid hybridization after labeling the test sample. *Anal Biochem* 1989; 177: 85-89
- 12 Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003; 52: 237-242
- 13 Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA

- abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 2001; 48: 198-205
- 14 Dore J, Sghir A, Hannequart-Gramet G, Corthier G, Pochart P. Design and evaluation of a 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for specific detection and quantitation of human faecal *Bacteroides* populations. *Syst Appl Microbiol* 1998; 21: 65-71
- 15 Sghir, A., Dore, J., and Mackie, R. I. Molecular diversity and phylogeny of human colonic bacteria. In: *Microbial Biosystems: New Frontiers*, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Bell CR, M. Brylinsky, P. Johnson-Green, eds. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada. 1999 Available from: plato.acadiau.ca/isme/Symposium14/sghir.PDF
- 16 Marteau P, Pochart P, Dore J, Bera-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4939-4942
- 17 Malinen E, Kassinen A, Rinttilä T, Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 2003; 149: 269-277
- 18 Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.C., Kamphuis, G., Wilkinson, M.H.F., and Welling, G.W. 1995. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probe and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3069-3075.
- 19 Reuter G. Probiotics--possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2001; 114: 410-419
- 20 Probert HM, Apajalahti JH, Rautonen N, Stowell J, Gibson GR. Polydextrose, lactitol, and fructooligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4505-4511
- 21 Harmsen HJ, Gibson GR, Elfferich P, Raangs GC, Wildeboer-Veloo AC, Argaz A, Roberfroid MB, Welling GW. Comparison of viable cell counts and fluorescence *in situ* hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 183: 125-129
- 22 Huber I, Spanggaard B, Appel KF, Rossen L, Nielsen T, Gram L. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J Appl Microbiol* 2004; 96: 117-132
- 23 Bruck WM, Kelleher SL, Gibson GR, Nielsen KE, Chatterton DE, Lonnerdal B. rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37: 273-280
- 24 Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence *in situ* hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1131-1140
- 25 Barc MC, Bourlioux F, Rigottier-Gois L, Charrin-Sarnel C, Janoir C, Boureau H, Dore J, Collignon A. Effect of amoxicillin-clavulanic acid on human fecal flora in a gnotobiotic mouse model assessed with fluorescence hybridization using group-specific 16S rRNA probes in combination with flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1365-1368
- 26 Shanahan F. Host-flora interactions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10 Suppl 1: S16-S24
- 27 Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* 2002; 50 Suppl 3: III54-III59
- 28 Gueimonde M, Tolkkio S, Korpimäki T, Salminen S. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4165-4169
- 29 Haarman M, Knol J. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 2318-2324
- 30 Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 3575-3581

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

人体与肠道微生物间的互惠共生关系

刘威, 姚文, 朱伟云

刘威, 姚文, 朱伟云, 南京农业大学动科院消化道微生物实验室 江苏省南京市 210095

国家杰出青年科学基金资助课题, No. 30025034

通讯作者: 朱伟云, 210095, 江苏省南京市, 南京农业大学动科院消化道微生物实验室. zhuweiyun@njau@hotmail.com

电话: 025-84395523 传真: 025-84395314

收稿日期: 2006-03-07 接受日期: 2006-03-20

摘要

研究宿主与肠道微生物之间相互关系的传统方法通常建立在体外(共)培养技术之上, 但现在已经证实, 绝大多数肠道微生物在目前培养技术下是体外不可培养的, 因此这种体外(共)培养技术存在着严重的缺陷. 分子生物学技术正在该领域里迅速地渗透和广泛地运用, 日益突破传统技术和方法的局限, 从而有助于我们深刻地揭示宿主与肠道微生物之间互惠共生的分子机制: 人肠道向肠道微生物提供优越的栖息和繁殖环境, 其中包括天然的厌氧条件, 丰富的营养物质, 以及适宜的温度和pH等; 肠道微生物及其代谢产物影响到人体的营养物质加工、能量平衡、免疫功能、胃肠道发育和成熟及其他多种重要的生理活动. 这种互惠共生关系可能是宿主与肠道微生物之间在长期的协同进化过程中相互选择和适应的结果.

关键词: 互惠共生; 人体; 肠道微生物; 分子机制

刘威, 姚文, 朱伟云. 人体与肠道微生物间的互惠共生关系. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1081-1088

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1081.asp>

0 引言

人的体表和体内栖生着许多种类和数量的正常微生物, 目前仅在人肠道内就已经鉴定出500多种正常肠道微生物(以下简称肠道微生物), 其数量高达 10^{14} , 约是人体体细胞和生殖细胞之和的10多倍, 也就是说成人体内细胞约有90%为微生物细胞, 其余约10%为人体细胞, 因此从某种意义上说一个完整、健康的成年人是诸多物种组成的复合体^[1]. 由于众多种类和数量的微生物栖息在人肠道内, 我们可以推测这些肠道微生物一定会通过宿主-微生物和微生物-微生物之间

关系网显著地影响人类生物学特征. 像生理学家描述人体普通器官一样, 有学者建议用“微生物器官”(microbial organ)来描述肠道微生物菌群: 他由不同种类的但彼此又相互联系, 并与宿主细胞之间不断地进行信息交流的细胞构成; 他消耗、存储和重新分布能量; 他生理性地调控重要化学物质转化; 他通过自我复制来维持和修复自身^[2]. 通常, 人们简单地用偏利共栖(commensalism), 而不是互惠共生(mutualism)来描述宿主和肠道微生物之间共生关系, 这反映出人类在这方面认识不足, 尚未意识到宿主与肠道微生物之间密切的关系, 以及肠道微生物对维持人类健康和正常菌落稳定的巨大贡献^[2-4]. 近年来分子生物学技术正在该学科领域里迅速地渗透和广泛地运用, 日益突破传统(共)培养技术和方法的局限, 在宿主-肠道微生物之间的协同进化、基因组、免疫和代谢等研究领域均取得许多重大突破, 本文就这些研究热点进行部分探讨.

1 宿主与肠道微生物在协同进化上的关系

基于16S rDNA 分析结果表明, 成人肠道包括三界细胞形态的生命: 细菌, 古菌和真核生物. 人肠道生态系统中的细菌在数量和密度上均占有绝对优势, 也是目前研究主要对象之一, 但其他不占优势的肠道微生物也会对宿主和菌群产生重要的影响. 例如人后肠中的甲烷菌, 他是肠道内古菌的典型代表, 位于多糖加工代谢链中最后一环, 可以利用上游微生物发酵产物 CO_2 和 H_2 合生 CH_4 , 通过降低肠道内氢分压来加快上游微生物发酵速率, 因此对维持肠道内环境的稳定性和菌落的多样性具有重要意义^[5-6]. 此外, 非细胞形态的噬菌体等也是肠道生态系统中不可忽视的要素, 例如感染*Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Bacteroides*的噬菌体可能对人肠道中菌群的多样性和结构产生很大的影响^[7].

肠道微生物的多样性可能是宿主和肠道微生物之间强烈选择和协同进化的结果^[8]. 宿主

■背景资料

肠道微生物及其基因组是人体重要的组成部分, 它们向人体提供某些没有必要在人体自身上进化出的生理功能和遗传特性. 当前的基因组革命正逐步从分子水平上深刻地揭示出肠道与肠道微生物通过彼此间协同进化形成互惠互利的共生复合体, 维持了肠道微生态系统长期稳定和动态平衡.

■研发前沿

基于16S rDNA分析技术,研究肠道微生物在不同地区和人种中分布状况,揭示肠道微生物的多态性;在分类的基础上,选择某些具有重要功能的代表性菌株进行基因组测序,充实现有的数据库,有利于从基因组、转录组、代谢组等水平上深入地研究宿主与肠道微生物间的关系。

主要通过两个手段—肠道切应力和肠道免疫应答—对肠道微生物菌群进行选择。肠道运动和食物流动产生切应力,可以将肠道内容物排出体外,对肠道各种微生物进行选择;肠道微生物通过采取一系列策略,黏附在食物颗粒、脱落的上皮细胞及肠道表面上,抵御一定强度的切应力,从而应对肠道切应力的选择作用。对正常微生物而言,他们在与宿主协同进化过程中进化出一套适应宿主切应力选择的特殊机制,肠道产生的切应力不但不会降低其黏附作用,反而会提高其黏附效率^[9]。宿主对肠道微生物进行选择的另一手段是肠道免疫应答,肠道通过建立一系列抗原识别、捕获、传递和加工处理等免疫应答机制,有效地将异体抗原排出体外,对肠道各种微生物进行选择;肠道微生物同样采取一定的策略(下述),才得以逃避肠道免疫应答。肠道微生物通过特定的策略,对付了肠道两种主要的选择作用,在宿主肠道内建立起生态位并固定下来,最终形成了稳定的肠道微生物菌群。肠道微生物这种适应能力归因于这些肠道微生物进化出多种改变自身基因组的“工具”(如质粒,转座酶,整合酶和转座子的同源序列等),这些基因转运和突变机制赋予肠道微生物“全能性”,以抵御肠道切应力和对付肠道免疫应答的选择作用,使其免遭从肠道内淘汰出去。在宿主对肠道微生物进行选择的同时,肠道微生物并不总是处于被动地位,也在不断地对宿主进行选择。肠道微生物的选择作用体现在两个层次上:首先,从肠道微生物角度上看,肠道微生物新陈代谢方式(如生长速度和底物利用方式)影响到整个肠道微生物菌群在竞争环境中的适合度;其次,从宿主角度上看,肠道微生物影响到宿主的适合度。如果这种选择作用对宿主有利,就会增加宿主数量,随之带来了自己生存环境的扩大,反之亦然。协同进化的结果带来了宿主获益和肠道微生物菌群多样性,其中生态系统中物种的多样性通常被认为是该生态系统正处于最佳稳定状态的一个标志,因为物种多样性可以向系统提供应付外界应激的弹性和缓冲力^[10]。

尽管我们目前对宿主与肠道微生物之间如何协同进化的过程不太清楚,学者们还是找到了许多相关的直接或间接证据。人类基因组和肠道微生物基因组提供了最具有说服力的证据,人类基因组编码223种与细菌蛋白高度同源

的蛋白^[3,11],暗示这些基因是直接从细菌基因中水平转运过去的,但是目前人肠道微生物基因组尚未完全破译出来,限制了这方面进一步的研究。尽管肠道微生物在亚种和株的水平上体现出多样性,例如目前就已鉴定出7000多株肠道细菌,但在更高分类级别上却相对稀疏,仅有55门已知细菌中的8门存在于人肠道中,而且尚有5门数量为之甚少。肠道微生物在亚种和株水平上体现出多样性与在门水平上体现的稀疏性形成鲜明对比,说明这些微生物之间存在相对高度的亲缘关系,间接地说明了宿主仅仅强烈地选择那些对宿主健康有利的少数物种。例如cytophaga-flavobacterium-bacteroides(CFB)是广泛地分布于哺乳动物肠道内的一门优势菌,基因库调查结果显示出这门肠道细菌在不同宿主体内的差异很大,揭示了CFB-哺乳动物之间的共生关系发生已经很久远和不同的CFB亚群一旦适应各自宿主,便经历加速进化过程,最终形成了现在差异性很大的亚群。尽管人类在研究宿主和肠道微生物之间协同进化关系上已经取得了很大的成绩,但仍需进一步考证现有的证据和探索其他的证据,并借鉴其他宿主-微生物之间协同进化的研究模型^[12-13],以获得更确凿的证据和更合理的推论,进一步揭示宿主与肠道微生物在进化过程中怎样有机地结合在一起,形成现存互惠共生的复合体。

2 宿主与肠道微生物在基因组上的关系

人肠道内种类繁多的正常微生物菌群向人们展示了肠道微生物基因组(microbial genome)的多样性和复杂性。尽管单株肠道微生物基因组通常小于人类基因组,但正常微生物在种类和数量上均占有绝对的优势,因此一个健康成年人肠道内正常微生物基因组数量通常是人类基因组的100多倍。微生物基因组的测序工作不仅有助于从基因结构、基因表达与调控及遗传与变异等方面揭示生命本质^[14-16],而且有助于我们研究宿主与肠道微生物之间互惠共生关系的分子机制^[17]。2003年, Xu *et al*^[18]首次完成了一种肠道菌*Bacteroides thetaiotaomicron*基因组的测序工作,在这个科研领域具有里程碑的意义,为我们在基因组水平上研究宿主与肠道微生物之间的互惠共生关系提供了极大的便利。结构基因组学预测*B. thetaiotaomicron*基因组共计编码蛋白质4779种,其中2782种(58%)为目前已知功能蛋

白的同源物, 848种(18%)为无功能蛋白的同源物, 1149种(24%)为目前数据库中尚未收录的蛋白质. 功能基因组学分析结果表明, 这些已知功能蛋白划分成如下四大功能区: 多糖摄取和降解(如细胞表面碳水化合物结合蛋白, 糖苷水解酶)、荚膜多糖合成(如糖苷转移酶)、环境感知和信号传导、DNA变异(如转座酶). 上述的功能蛋白分区化反映出肠道微生物为适应宿主而采取的高度进化策略: (1)获取食物多糖; (2)感知肠道的环境; (3)改变宿主和自身基因表达, 以建立与宿主之间互惠互利的关系. 比较基因组学通过与人类基因组比较分析, 发现了宿主与肠道微生物之间更有趣的互惠共生关系. 例如菌株 *B. thetaiotaomicron* ATCC 29 184仅有的6.3-Mb基因组编码出163种利用淀粉的蛋白, 226种糖苷水解酶和15种多糖裂解酶; 而人类2.85-Gb基因组仅编码98种已知或预测具有水解糖苷的酶, 缺乏降解植物纤维中常见成分如木聚糖、果胶、阿拉伯糖等相关酶类. 人类基因组和微生物基因组之间比较, 一方面充分地揭示了 *B. thetaiotaomicron* 具有惊人的利用人类非可消化性食物多糖能力的分子机制, 另一方面深刻地揭示出这些肠道微生物群落及其基因组赋予人类一些没有必要在人类自身上进化出的遗传和代谢功能, 从而弥补人类某些生物学缺陷. 因此, 肠道微生物基因组的研究具有重要价值, 可以帮助我们破解宿主与肠道微生物之间互惠共生关系的分子机制.

人类基因组工程(human genome project, HGP)的完成是人类历史上一次重大的事件^[19-20]. 人类基因组破解有助于人类认识环境因素和遗传物质通过互作, 共同影响人类健康和致人患病. 但是一个完整的人体由人体部分(*Homo sapiens*)和正常微生物两部分组成, 因此完整的人类基因组(metagenome, 宏基因组)既包括当前已经破解出的人类基因组部分, 还应包括正常微生物基因组部分. 诺贝尔奖殊荣获得者 Joshua Lederberge 曾经建议用一个术语-微生物组(microbiome)定义人体内正常微生物基因组的集合, 以区别于人类自身的基因组部分, 因为这些微生物组是嵌入在人类宏基因组中不可或缺的部分, 他们向人类提供许多在人体细胞中尚未进化出或没有必要进化的功能. 但由于微生物种类众多, 微生物基因组数量非常庞大, 远远多于人类基因组数量, 因此人类宏基因组

工程还有一段很长的路要走.

3 宿主与肠道微生物在免疫学上的关系

对宿主与肠道微生物在免疫学上的研究起始于一个有趣的现象: 肠道免疫系统能够对病原微生物产生免疫应答, 却对食物和肠道微生物产生免疫耐受, 即通常所说的免疫学矛盾(immunology paradox)^[21]. 前肠中抗原主要来自于食物, 而回肠和结肠中抗原不仅来自于食物, 还增加了复杂的肠道微生物. 这些食物和肠道微生物与普通抗原一样, 在体外试验中均能引起免疫应答, 在体内却通常产生免疫惰性. 至今人们尚未完全揭示出肠道免疫系统对食物和肠道微生物产生免疫耐受的机制, 但下面几个方面的研究有助于加深对这一机制的认识.

首先, 肠道屏障向肠道免疫系统提供一道天然防线. 每个肠上皮细胞与其相邻的细胞通过紧密连接将肠道表面密封起来, 并且肠道分泌细胞分泌许多先天性防御物质如 α -防卫素、T细胞非依赖性SIgA和黏液素等到肠道的表面形成黏液层^[22-24], 由这两者共同组成了肠道屏障. 这道屏障向肠道提供了一道天然的物理防线, 可以有效地阻止绝大多数肠道微生物越过肠壁和侵入肠道免疫系统. 尽管肠道屏障有效地阻碍了绝大多数抗原的入侵, 但是并不能够阻止全部抗原的入侵, 例如现已在人血浆中发现完整的食物蛋白质颗粒以及在中肠淋巴结发现了少量肠道微生物^[25], 但这些越过肠道屏障的抗原通常会被巨噬细胞内吞和消灭掉, 并不会显著地激发促炎因子^[26].

其次, 宿主区室化表达与肠道免疫识别相关的抗原受体. 基因表达通常是受到调控的, 在不同组织和/或同一组织不同位置的基因表达存在着一定差异, 与肠道内抗原识别相关受体的表达也不例外. TLR(toll-like receptor, TLR)是一个在先天免疫中发挥着重要作用的受体家族, 能够识别微生物抗原, 引发肠道免疫应答, 常常会引发免疫性肠炎. TLR5是这个受体家族一个成员, 通过与细菌(包括病原菌和正常肠道菌)鞭毛素特异结合, 引发肠道免疫应答^[27-28]. 免疫定位技术发现这些TLR5仅分布在肠上皮细胞的基底面, 在游离面尚未发现这种受体^[29]. 由于只有病原菌能够分泌毒素, 可以改变肠壁的通透性, 才使得病原菌鞭毛素得以越过肠道, 并与TLR5发生特异性结合, 并作为外源信号激活转录因子

■创新盘点

本文根据最新和最具有权威的研究报道, 将一些全新的概念引入国内肠道微生物研究, 比如微生物器官、人体宏基因组、分子拟态以及微生物代谢组等, 并且能够在这些报道基础上进行归纳和总结, 将宿主与肠道微生物复杂的共生关系分成四个专题进行探讨, 以期与国内学者和医疗人员共同分享研究成果.

■应用要点

肠道菌群失调常常诱发多种肠道疾病, 比如肠炎、腹泻、肿瘤等, 这些疾病在世界范围内, 严重地危害了人类的健康。抗生素曾经作为治疗肠道疾病的有效药物, 但现在暴露出抗药性残留和转移等弊端; 人们正研究益生菌(probiotics)作用机制, 试图利用益生菌代替抗生素, 通过恢复肠道菌群平衡而恢复人体健康。

NF- κ B, 最终导致下游促炎基因表达, 引发免疫性肠炎。

再次, 肠道微生物的分子拟态(molecular mimicry). 肠道微生物不仅水解植物多糖, 而且某些肠道微生物能够水解宿主细胞表面的多种多糖, 包括硫酸软骨素、黏液素、肝素等, 并且可以利用这些宿主多糖作为原料, 模拟宿主细胞表面结构而合成自身的荚膜多糖。L-岩藻糖是在这个方面研究比较多的一种结构单糖, 他参与构建宿主细胞表面糖蛋白和肠道微生物荚膜多糖, 构成细胞表面抗原。一方面肠道微生物诱导肠上皮细胞利用L-岩藻糖合成细胞表面的糖蛋白和糖脂, 产生特殊的肠上皮细胞抗原; 另一个方面肠道微生物黏附到宿主肠上皮细胞上, 分泌相关的糖苷水解酶水解出L-岩藻糖, 以宿主的L-岩藻糖为原料, 模拟宿主细胞表面糖蛋白和糖脂的抗原特征, 将自己荚膜表面修饰出以L-岩藻糖残基为主的糖蛋白和糖脂。肠道微生物进化出来的降解和利用宿主多糖的适应能力可以主动地改造宿主和自身的表面抗原性质, 最终宿主和肠道微生物间协同作用使得两者表面抗原高度同质化, 以逃避宿主免疫细胞的识别, 从而宿主肠道免疫系统对这些肠道微生物产生免疫耐受^[21,30]。

关于肠道免疫系统对肠道微生物免疫耐受, 上述的理论或假说均作出了部分合理解释, 但详细的作用机制仍需进一步的研究。尽管宿主需要复杂的机制对肠道微生物产生免疫耐受, 但肠道微生物又是维持和发挥人肠道正常免疫功能所必需的, 特别是对新生儿尤为重要, 因为这些肠道微生物促进早期肠道的发育成熟, 帮助肠道建立起完善的免疫功能。例如无菌老鼠在肠道发育期血管的生成受阻, 肠腺发育不完全; 无菌老鼠口服卵清蛋白不能产生T辅助细胞介导的免疫应答, 但接种常规饲养动物断奶前肠内容物之后, 这些老鼠则能够产生免疫应答^[31]。因此, 肠道微生物在肠道发育和成熟过程中发挥重要的作用, 是肠道建立起正常的免疫功能所必需的。

4 宿主与肠道微生物在代谢上的关系

宿主与肠道微生物之间的代谢关系是人类研究比较早的内容, 目前对这方面知识了解得相对比较清楚, 但两者之间的代谢关系却又是最为错综复杂的关系, 因为彼此之间的代谢关系涉及宿主和肠道微生物生命整个过程和各个方面。

最新的研究结果表明: 人肠道为肠道微生物提供优越的栖息和繁殖环境; 肠道微生物及其基因组赋予人类没有必要在自身上进化的代谢特性, 弥补人类某些生物学不足。

宿主满足了肠道微生物生长和繁殖所需要的各种生理条件, 包括氧气天然的隔绝, 充足的营养物质, 以及适宜的温度和pH值等。绝大多数生活在肠道内的微生物是专性或兼性厌氧微生物, 他们的生长和繁殖需要自然界中很少见的厌氧环境, 肠道生理特性可以为专性和兼性厌氧微生物创造出所需的厌氧环境。少量随食物颗粒混进肠道的氧气在肠道上部就很快被肠道内的好氧菌和兼性菌所耗尽, 加之肠壁对氧气的通透性, 从而形成了后肠天然的厌氧环境, 满足了后肠专性或兼性厌氧微生物发酵所需的厌氧要求。宿主营养物质的供应也会显著地影响肠道微生物的代谢方式。例如*B. thetaiotaomicon*在肠道食物充足时常常富集在食物颗粒, 充分利用肠道内容物中糖源, 而当食物性多糖供应不足时, 便转向宿主的黏膜和肠上皮细胞, 利用宿主细胞表面糖蛋白和糖脂上面辍合多糖^[32]。另一个宿主的营养物质供应影响肠道微生物代谢的例证来自于碳代谢物抑制现象^[33]: 能量利用效率高的物质(如葡萄糖和蔗糖等)通常会抑制肠道微生物利用其他的能源物质如纤维素、几丁质、木聚糖、淀粉、乳酸等。这种抑制现象在自然界中普遍存在, 可能是由于葡萄糖抑制了一些关键酶的表达或活性而造成的。宿主多糖供应的多样性与肠道微生物利用宿主多糖的可控性保障该系统(宿主和肠道微生物)能够根据食物的变化来调整代谢方式和进行能量重新分布, 最大可能地保证肠道内正常菌群在食物变动中不发生本质的变化, 从而有利于维持肠道生态系统的稳定性。此外, 恒定的温度和接近中性pH也为肠道微生物的生长和繁殖提供了必要的生理条件。总之, 人体向肠道微生物, 特别是专性厌氧微生物, 提供了适宜的生存环境, 满足了其生长和繁殖所需的条件。

同样, 肠道微生物及其代谢产物对宿主的能量平衡和生理活动也产生重要的影响。肠道微生物能够降解和发酵非可消化碳水化合物, 补救出部分能量, 可以再次被宿主吸收和利用, 扩大了宿主可利用原料的范围和提高了能量利用效率。研究发现常规饲养和无菌动物在饲喂相同食物条件下, 尽管常规饲养动物消耗饲料少, 但积蓄的体脂却比无菌动物多40%; 这些成

年无菌动物在饲喂常规饲养动物结肠内容物之后, 其体脂很快恢复到了常规饲养动物的体脂水平, 并且发现饲喂结肠内容物无菌动物体脂增加方式源自于脂肪细胞的肥大, 而不是脂肪细胞的过度分裂增生^[34]. 上面的研究可以部分地回答了看似矛盾的现象: 肠道微生物自身的生长和繁殖需要消耗大量来自食物中的能量, 却最终减少了宿主能量需求. 因此肠道微生物是影响宿主能量摄入、分布和消耗的重要因素之一. 肠道微生物对宿主代谢功能和健康同样会产生重要影响, 受关注程度最高当属膳食纤维对某些营养代谢性疾病的延缓和控制. 自第二次世界大战以来, 生活水平在西方发达国家中逐步地提高, 饮食不合理和缺乏锻炼导致的肥胖症已成为社会一大公害, 心血管疾病和结肠直肠癌在西方社会里已经成为位居前列的两大杀手. 这些危机引起营养学家们对低消化率的膳食纤维关注, 因为这些膳食纤维不仅在小肠中作为抗营养物质, 能够降低肠道对葡萄糖和脂类物质的消化和吸收, 对心血管有益^[35], 而且可以在后肠中作为微生物的发酵底物, 产生对人体有益的短链脂肪酸, 特别是丁酸^[36-42], 向宿主结肠上皮细胞提供比葡萄糖更优化的碳源和能源, 促进肠上皮细胞的生长, 加速受损肠黏膜的修复, 生理性地调控肠上皮细胞基因表达, 有效地抑制肠炎和结肠直肠癌的发生. 最新版的Dietary Guideline for Americans 2005在报告中再次强调了膳食纤维和全谷类食物的重要性, 并且给出新的建议, 建议每人每天水果和蔬菜的摄入量几乎是上一版(2000年)摄入量的2倍^[43]. 之所以如此大幅度地增加饮食中膳食纤维的摄入量, 归因于这些膳食纤维可以作为功能食品, 具有独特的抗营养作用和作为肠道微生物丰富而又廉价的发酵原料, 在维持宿主健康和预防疾病上发挥着重要的作用.

总之, 宿主和肠道微生物在长期的协同进化过程中形成了相互协作关系, 二者共同组成肠道微生态系统, 保障了该系统最大限度地从有限的食物中获取最大可能的营养价值, 维护了系统长期稳定和动态平衡^[44].

尽管人类对宿主-肠道微生物之间关系的研究已经取得了卓有成效的成绩, 但我们现在仍未完全研究清楚宿主-肠道微生物之间错综复杂的关系. 与其他复杂的生态系统一样, 绝大多数肠道微生物体外不易或不能培养的客观事实阻

碍了我们对宿主与肠道微生物之间关系的研究; 当前学术界的研究主要集中在病原菌和具有商业利润的古菌上^[45], 常常忽略掉与人类健康息息相关的正常肠道微生物, 成为这个研究领域又一大桎梏. 实际上宿主与肠道微生物之间关系的研究很具有挑战性, 需要诸多学科的专家和学者共同努力, 迫切需要解决以下几个主要方面的问题: 首先, 基于16S rDNA序列分析技术之上, 阐明肠道微生物在不同种族和不同地区人口中的分布状况^[46], 充实现有数据库, 为研究宿主和肠道微生物之间关系提供宝贵的资料. 其次, 扩大肠道微生物基因组的测序工作. 这项工程将是人类基因组工程的延续, 微生物基因组的测序和研究有利于在基因组水平上确定肠道微生物在不同人群中的多态性, 有助于揭示其进化历史怎样与基因组有机地结合在一起. 再次, 我们仍需要获得更直接的关于肠道微生物代谢产物如何影响宿主生理的知识. 这是一件极其繁重的任务, 需要新技术来更精确地检测肠道微生物在特定条件下的代谢产物, 比如在特定的营养条件下, 检测单一和几种已知菌株分别(共)培养在恒化器或更精妙的肠道模拟器或悉生动物体内的代谢产物, 这些结果可以促进形成关于肠道微生物代谢组(metabolome)的假说. 目前关于微生态系统在分子水平上的资料还很少, 人肠道微生物基因组的研究需要从这些天然和复杂的肠道微生物群落中获得关于基因组、转录组(transcriptome)和代谢组的第一手资料, 最终形成微生物代谢组学说.

最后, 我们的研究也要像宿主肠道内的微生物一样, 需要借鉴和应用来自其他领域和学科中的新观念和新技术, 和其他的学科共同进步, 从而有助于提升人类在这个领域现有知识水平.

5 参考文献

- 1 Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977; 31: 107-133
- 2 Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307: 1915-1920
- 3 Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292: 1115-1118
- 4 Hooper LV, Bry L, Falk PG, Gordon JI. Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. *Bioessays* 1998; 20: 336-343
- 5 Strocchi A, Furne J, Ellis C, Levitt MD. Methanogens outcompete sulphate reducing bacteria for H₂

■名词解释

正常肠道微生物菌群(normal intestinal microflora): 通常定义为健康成年人肠道内稳定栖生的微生物集合体, 大约由30属500多种微生物组成, 但正常菌群的种类、数量和分布受到年龄、人种、膳食结构、生活习惯等因素影响, 因此正常微生物又体现出时空的复杂性.

同行评价

宿主与肠道微生物之间的相互关系对人类的健康、临床消化系统疾病防治等方面具有重要的意义。本文从进化、基因组、免疫以及代谢方面对人体与肠道微生物之间相互关系进行了深入浅出的综述。因此,对医学基础研究、预防保健以及临床工作均有参考和指导意义。文章文笔流畅、逻辑准确、文字精炼以及引用的文献比较新,是一篇比较新颖的文章。

- in the human colon. *Gut* 1994; 35: 1098-1101
- 6 Strocchi A, Furne JK, Ellis CJ, Levitt MD. Competition for hydrogen by human faecal bacteria: evidence for the predominance of methane producing bacteria. *Gut* 1991; 32: 1498-1501
- 7 Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P, Rohwer F. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol* 2003; 185: 6220-6223
- 8 Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124: 837-848
- 9 Isberg RR, Barnes P. Dancing with the host: flow-dependent bacterial adhesion. *Cell* 2002; 110: 1-4
- 10 Rainey PB, Rainey K. Evolution of cooperation and conflict in experimental bacterial populations. *Nature* 2003; 425: 72-74
- 11 Weaver RF. Molecular biology. 2nded. New York: the Mc-Hill companies, 2002: 784-797
- 12 Currie CR, Poulsen M, Mendenhall J, Boomsma JJ, Billen J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science* 2006; 311: 81-83
- 13 Hong SH, Kim JS, Lee SY, In YH, Choi SS, Rih JK, Kim CH, Jeong H, Hur CG, Kim JJ. The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1275-1281
- 14 Rescot LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology. 5thed. New York: The McGraw-Hill companies, 2002: 344-356
- 15 贾文祥主编. 医学微生物学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 159-169
- 16 龙北国主编. 高级医学微生物学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 1-6
- 17 Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-bacterial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291: 881-884
- 18 Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, Hooper LV, Gordon JI. A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science* 2003; 299: 2074-2076
- 19 Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Showkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921
- 20 Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H,

- Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferreira S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkuch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooshep S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351
- 21 Coyne MJ, Reinap B, Lee MM, Comstock LE. Human symbionts use a host-like pathway for surface fucosylation. *Science* 2005; 307: 1778-1781
- 22 Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000; 1: 113-118
- 23 Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000; 288: 2222-2226
- 24 Kojima K, Musch MW, Ren H, Boone DL, Hendrickson BA, Ma A, Chang EB. Enteric flora and lymphocyte-derived cytokines determine expression of heat shock proteins in mouse colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2003; 124: 1395-1407
- 25 Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* 1995; 3: 149-154
- 26 Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 2005; 307: 1920-1925
- 27 Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003; 85: 85-95
- 28 Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 103-110
- 29 Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Paul J, Godowski PJ, Madara JL. Cutting Edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR-5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001; 167: 1882-1885
- 30 Krinos CM, Coyne MJ, Weinacht KG, Tzianabos AO, Kasper DL, Comstock LE. Extensive surface diversity of a commensal microorganism by multiple DNA inversions. *Nature* 2001; 414: 555-558
- 31 Lynn B, Per FG, Tore M, Gordon JI. A model of host-microbial interaction in an open mammalian ecosystem. *Science* 1996; 273: 1380-1383
- 32 Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, Buhler JD, Gordon JI. Glycan foraging *in vivo* by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science* 2005; 307: 1955-1959
- 33 Rodriguez S, Santamaria RI, Fernandez-Abalos JM, Diaz M. Identification of the sequences involved in the glucose-repressed transcription of the *Streptomyces halstedii* JM8 xysA promoter. *Gene* 2005; 351: 1-9
- 34 Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 15718-15723
- 35 Scheppach W, Luehrs H, Menzel T. Beneficial health effects of low-digestible carbohydrate consumption. *Br J Nutr* 2001; 85 (Suppl 1): S23-S30
- 36 Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 217: 133-139
- 37 Brouns F, Kettlitz B, Arrigoni E. Resistant starch and "the butyrate revolution". *Trends Food Sci & Technol* 2002; 13: 251-261
- 38 Jacobasch G, Schmiedl D, Kruschewski M, Schmehl K. Dietary resistant starch and chronic inflammatory bowel diseases. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14: 201-211
- 39 Della Ragione F, Criniti V, Della Pietra V, Borriello A, Oliva A, Indaco S, Yamamoto T, Zappia V. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett* 2001; 499: 199-204
- 40 Uncan SH, Louis P, Flint JH. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5810-5817
- 41 Li H, Myeroff L, Smiraglia D, Romero MF, Pretlow TP, Kasturi L, Lutterbaugh J, Rerko RM, Casey G, Issa JP, Willis J, Willson JK, Plass C, Markowitz SD. SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8412-8417
- 42 Gupta N, Martin PM, Prasad PD, Ganapathy V. SLC5A8(SMCT1)-mediated transport of butyrate forms the basis for the tumor suppressive function of the transporter. *Life Sci* 2006; 78: 2419-2425
- 43 U. S. Department of Health and Human Services, U. S. Department of Agriculture. Dietary Guidelines for Americans 2005. Available from: URT: <http://www.healthierus.gov/dietaryguidelines/>
- 44 Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*

- 2002; 22: 283-307
- 45 Nelson KE, Paulsen IT, Heidelberg JF, Fraser CM. Status of genome projects for nonpathogenic bacteria and archaea. *Nature Biotechnol* 2000; 18: 1049-1054

- 46 Hold GL, Pryde SE, Russell VJ, Furrie E, Flint HJ. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 2002; 39: 33-39

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知

本刊讯 为了进一步推动华北地区(北京、天津、河北、山西和内蒙)的消化学术交流与发展、帮助广大消化专业工作者全面了解国内外消化基础和临床研究进展,提高消化疾病诊治和研究水平,第十二届华北地区消化学术会议,将于2006-10-27/29在河北省石家庄举办。会议由北京、天津、河北、山西和内蒙医学会消化病学分会联合主办,河北省医学会消化病学分会承办。本次会议将就近年来国内外消化领域的研究进展、诊断和治疗方面的新技术、新方法进行广泛的学术交流,大会将邀请国内著名消化病学专家作专题学术报告。欢迎消化界各位专家和同仁积极投稿参会,参会者可获得国家级 I 类继续教育学分。会务费: 500元(含餐费及资料费), 交通住宿费自理。

1 征文内容

- (1)消化系统疾病流行病学、发病机制、诊断和治疗的研究进展;
- (2)消化系统肿瘤的发病机制、诊断和治疗以及预防的进展;
- (3)消化内镜的应用现状及内镜下诊断和治疗的表演;
- (4)慢性肝病及肝癌近年来的发病情况治疗研究进展;
- (5)当前医源性疾病在消化疾病方面的表现与现状;
- (6)消化疾病在当前临床研究中热点、难点,需要解决的问题。

2 征稿要求

来稿要求是未在国内外刊物上公开发表过的论文, 800字摘要一份, 摘要应包括: 目的、材料和方法、结果和结论4个部分。来稿一律使用A4纸打印、WORD格式, 并附软盘或发电子邮件至: huabeixiaohua@yahoo.com.cn。

截稿日期: 2006-08-30, 以当地邮戳为准。请务必在信封右上角注明“华北区消化会议”字样。

会议地址: 河北医科大学第二医院图书馆楼三楼会议室

联系人: 河北省医学会学术会务部(邮政编码050011) 徐辉 电话: 0311-85988457

河北医科大学第二医院(邮政编码050000)蒋树林 电话: 0311-87222301; 0311-87222951

HBV与HIV重叠感染及其影响

曹晓沧, 连佳, 吕宗舜

曹晓沧, 中国医学科学院协和医科大学实验血液学国家重点实验室天津医科大学总医院 天津市 300020

连佳, 吕宗舜, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

通讯作者: 连佳, 300052. 天津市, 天津医科大学总医院消化科. doccaoxc@163.com

电话: 022-60363615

收稿日期: 2006-02-17 接受日期: 2006-03-11

摘要

我国作为乙型肝炎大国, 面临乙肝的严重威胁, 而HIV和HBV的传播途径相似, HIV/HBV重叠感染可加速HIV感染者的病程并增加其死亡率, 同时也影响到HBV感染的自然史. 现就近年的相关文献作简要回顾, 以进一步提高临床工作者的认识和警惕性.

关键词: 乙肝病毒; 人类免疫缺陷病毒; 超感染; 共感染

曹晓沧, 连佳, 吕宗舜. HBV与HIV重叠感染及其影响. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1089-1092

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1089.asp>

0 引言

人类免疫缺陷病毒(HIV)和乙肝病毒(HBV)的传播途径相似, 包括静脉注射毒品、血友病、多次输血、(同/异性)性传播途径和围产期垂直传播, 均可引起重叠感染(超感染或共感染), 导致病毒生物学的行为改变, 使感染者临床表现复杂化. 超感染^[1](super-infection)指的是一株毒株在机体内已经建立稳定感染之后受到另外毒株的感染. 共感染(co-infection)则是两株病毒同时或几乎同时对机体的感染. 超感染发生的背景是宿主已经存在针对一种病毒特异性的免疫反应并且免疫系统在某种程度上受到初次感染病毒的损伤. 由于艾滋病大多在高危人群中发生感染, 而乙肝在正常人群中发生感染, HBV持续感染时间比HIV长, 因此在HBV背景下发生HIV超感染的几率远大于共感染.

1 HBV/HIV重叠感染的流行病学

我国自1985-06发现1例外籍人免疫缺陷综合征(AIDS)患者, 至2004年估计HIV感染者已达84

万人^[2]. HBV在一般人群中的感染较常见, 人群中乙型肝炎表面抗原(HBsAg)携带率约为10%, 全球慢性乙肝病毒感染者多达3.6亿, 我国占1.2亿. 在HIV患者中有HBV标志的患者明显高于HBsAg阳性的患者比例(表1), 一般认为有HBV标志的HIV患者中多数表示过去感染过HBV, 并非正在发生乙型肝炎. 因此在乙型肝炎大国的我国研究HBV背景下发生HIV超感染有重要意义. 在中国和东南亚一些国家, 引起HBV/HIV重叠感染的主要原因是静脉注射毒品; 而欧美和非洲等国家主要由性混乱所致. 男同性恋者中和输用血制品者中也有很高的HBV/HIV重叠感染率. 此外, 由于HIV、HBV均可经母婴传播. 因此有高危因素的母亲所生的婴儿也是HBV/HIV重叠感染的高危人群, 但有关这方面的研究目前还不多.

2 病毒学基础研究

虽然HBV为嗜肝病毒, HIV为非嗜肝病毒, 但研究显示HBV也能感染T-淋巴细胞, 因此在感染了两种病毒的患者体内病毒可能在细胞水平相遇. 其结果是两种病毒相互促进彼此基因的转录复制, 加速彼此的病情进展, 使病情恶化. HIV阳性患者感染HBV预后更差, HBV感染者似乎对HIV更易感.

2.1 乙肝病毒 HBV基因组是一环状部分双股的DNA分子, 分为长的负链(L)和短的正链(S). L链有4个开放读码区ORF(S, C, P, X区), 编码的蛋白分别为HBsAg、HBcAg/HBeAg、HBV DNA多聚酶及x蛋白(HBx, px). 最令人感兴趣的是乙肝病毒x基因编码的HBx, 他含有154个氨基酸, 分子量17 kDa, HBx活性区由第49到143氨基酸组成, 以第107至130氨基酸活性最为重要, 在N端有一促转录活性负性调节区. 由于其基因位于基因组内功能重叠最明显的区域, 因此决定了HBx功能的多样性. 反式激活作用(transactivating)是人们最早发现的同时也是研究最深入的HBx的一个主要作用方式. 他能广泛激活病毒和细胞的启动子, 促进病毒的复制与细胞的转录增生,

■背景资料

在感染HBV-HIV的患者体内两种病毒相互促进彼此基因的转录复制, 加速彼此的病情进展, 使病情恶化; 同时可能发生基因重组而产生新的变异, 影响治疗效果. 治疗的突破有赖于对重叠感染机制的深入研究.

■名词解释

病毒的重叠感染包括超感染和共感染,均导致病毒生物学行为改变。

1 超感染(super-infection)指的是一株毒株在机体内已经建立稳定感染之后受到另外毒株的感染。超感染发生的背景是宿主已经存在针对一种病毒特异性的免疫反应并且免疫系统在某种程度上受到初次感染病毒的损伤。

2 共感染(Co-infection)则是两株病毒同时或几乎同时对机体的感染。

表 1 HBV/HIV重叠感染的国内外报告情况

地区/作者	HIV感染 总数	HBsAg		HBV标志物 ¹		报道日期
		阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	
美国 ^[3]	2559	213	8.32%	—	—	2002年
日本 ^[4]	471	42	8.9%	317	67.3%	2005年
尼日利亚 ^[5]	383	37	9.66%	—	—	2004年
意大利	149	10	6.7%	—	—	2005年
印度 ^[6]	80	6	7.5%	22	27.5%	2001年
新加坡 ^[7]	47	4	8.5%	29	61.7%	1995年
河南省 ^[8]	197	10	5.19%	102	51.95%	1999年
广东省 ^[9]	128	5	3.13%	—	—	2003年
董培玲 <i>et al</i> ^[10]	144	4	2.80%	66	45.8%	2003年
周志平 <i>et al</i> ^[11]	43	2	4.65%	20	46.51%	2004年

¹HBV标志物指anti-HBs和/或anti-HBc阳性。

干扰正常转录。研究表明,HBx的反式激活作用具有双重机制:既可激活信号传导系统,又可直接作用于细胞转化因子。目前已知的与HBx反式激活作用有关的细胞因子有多种类型,包括ATF/CREB(Cyclic AMP-responsive element-binding protein)家族蛋白, b-ZIP转化因子家族, Ras-Raf-MAP激酶系统, PKC激活途径, 转化因子TBP(TATA-binding protein, TATA框结合蛋白^[12])及丝氨酸蛋白酶等。RNA聚合酶II亚单位RPB5介导蛋白(RPB5 mediate protein, RMP)可与HBx竞争结合普通转录因子TF II B(general transcription factor, TF II B)而抑制HBx的反式激活作用^[13-14]。HBx众多功能的机制尚不明确。但其具有的反式激活作用能促进多种肿瘤相关基因的表达,与HBV感染后HCC的发生密切相关^[15]。

2.2 人类免疫缺陷病毒 根据血清学反应HIV分为HIV-1和HIV-2两型。HIV属逆转录病毒科单股正链RNA病毒。感染敏感细胞后单链RNA基因组需反转录为双链DNA并与宿主细胞的基因组整合才能完成其生命周期。前病毒DNA基因组与单链RNA基因组的区别在于DNA基因组两端形成了长末端重复序列(long terminal repeats, LTR),由U3、R、U5区三部分组成。U5之后为gag引导序列(GLS, gag leading sequence),包括PBS(tRNA primer binding sequence)和SD(major splice donor)序列。HIV-1 LTR的U3区长453 bp、R区长98 bp、U5区长83 bp。拥有3个结构基因:gag, pol, evn和6个调节基因。LTR实际上是一个启动子,由U3区和R区启动元件以及pol基因的内部启动子对病毒的表达和其他生命活动起调控作用, U3区和R区从5'端到3'端依次为负调节序列(negative regulation sequence, NR)、增强

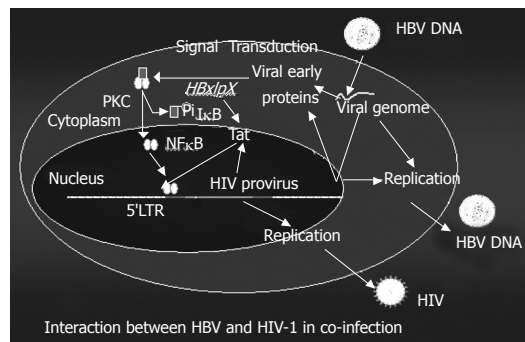


图 1 HBV/HIV重叠感染机制示意图。

子(enhancer, EN)、反式激活应答元件(TAR元件, trans-activating responsive element), U5区与病毒的DNA整合有关。HIV-1 LTR在多种病毒和大肠杆菌中具有启动子作用,可促进外源基因的表达^[16]。NR序列含有多种真核表达的调控元件,包括AP-1(adaptor protein-1), T cell factor B, Gata b(GATA binding protein), Myb, USF, COUP-TF, NF-AT, LEF-1(lymphoid enhancer factor-1)。因细胞类型不同,即细胞中反式蛋白不同,则不同的顺式功能区被激活,有时表现为正调节,有时表现为负调节,甚至没有作用。EN序列,长约120 bp,其中有两个NF-κB(nuclear factor κB)蛋白的结合基元、3个SP1(stimulating protein 1)蛋白结合基元和1个TATA盒,细胞的反式作用因子和该区域结合后,可增强多种类型启动子的活性。TAR序列可在前病毒基因组DNA转录生成的mRNA 5'端形成稳定的茎环结构,进而与病毒编码的Tat蛋白结合促进转录^[17],而且TAR DNA还能与多种细胞因子如LBP-1(Leader region binding protein)等结合,调节基因表达^[18]。将TAR DNA置于外源启动子中,可提高外源启动子的本底(basal)和Tat蛋白诱导活性^[19]。

2.3 HBx与HBV/HIV重叠感染 HBV/HIV感染对两者病毒的复制及疾病的进程都有相辅相成的作用。(1)反式激活作用: HIV在潜伏期病毒复制水平较低,并只在淋巴器官中进行,而在大部分循环CD4⁺T淋巴细胞中没有病毒的转录、复制^[20]。因此认为HIV的再活化依赖T细胞的激活。HBx具有的反式激活作用,能促进多种肿瘤相关基因的表达。片山和宏 *et al*^[21]报道HBx基因能使LTR活化,另一方面使宿主淋巴细胞产生白细胞介素2(IL-2)的受体。同年加利福尼亚一科研组将乙肝病毒的基因片段在体外插入含有HIV的细胞中,以研究HBV/HIV之间的联系。他们发现,HBV感染细胞所产生的“X”蛋白可触发

HIV基因的生成, 从而导致HIV复制. 如图1所示. 新近研究显示, HBx诱导HIV-1复制和HIV-1的LTR的转录可能是通过与Tat蛋白和T细胞活化信号途径的协同作用实现. 虽然在诱导结合在HIV-1 κ B增强子上的报告质粒时, HBx与有丝分裂促进剂通过NF- κ B依赖途径和NF-AT(nuclear factor of activated T cells)依赖途径起协同作用, 但LTR中缺失这些成分并不影响HBx在同时存在Tat和/或有丝分裂原(mitogens)条件下介导的上调作用; 另一方面, 在接近LTR的Sp1结合位点的突变并且只有同时消除 κ B增强子的条件下才可以消除HBx介导的协同作用. 当HBx作用细胞核时, 其协同细胞活化激活物的作用会持续存在, 而且影响HBx与基本转录机制间相互作用的HBx突变能消除依赖HBx的协同活化效应. 这些现象说明HBx是作为细胞核协同激活剂发挥作用的. 因此HBx可能加速HBV/HIV感染的AIDS病人的病程进展^[22], 但还需流行病学和临床观察的进一步证实. 乙肝病毒产生的HBx在艾滋病病毒复制过程中起重要作用的事实可解释为什么几乎90%的艾滋病患者同时也被乙肝病毒感染的内在原因. (2)重组作用: 另有资料指出, 在HIV感染患者的末梢血单核细胞内有与HBV和HIV DNAs两者相关的3.2 kb DNA片段, 带有HIV pol 基因的一部分, 提示HBV和HIV DNAs之间在体内的重组作用, 并发现3.2 kb DNA是一种促进HBV与HIV DNAs基因自然重组的DNA片段. 他不仅在艾滋病患者发病机制中起作用, 而且在其他人类疾病的病毒基因间的重组中也可能起作用. Laure *et al*^[23]发现75例艾滋病患者中有2例HBV相关的3.2 kb DNA不被EcoRr所消化, 因而提出3.2 kb HBV/HIV重组DNA在艾滋病患者的发病机制中可能起作用. 最近Daesberg在艾滋病起因中提出需要足够数量的HIV才能发病, 而HBV的参与可能是研究艾滋病发病机制的又一新途径. 总之, 在感染HBV/HIV的患者体内两种病毒相互促进彼此基因的转录复制加速彼此的病情进展, 使病情恶化; 同时可能发生基因重组而产生新的变异, 影响治疗效果.

3 临床诊治现状

3.1 临床特点 如前所述, 慢性HBV携带者和乙型肝炎急慢性患者在存在HIV病原传播的条件下对HIV更易感; HIV阳性患者感染HBV预后更差. HIV感染的基本特征为CD4耗竭、T细胞数下降

和T细胞亚群CD4/CD8比值降低, 导致一系列免疫缺陷综合征; 慢性乙型肝炎的恶化必须依赖于病毒复制的免疫反应. 当HBV与HIV在患者体内并存时, 由于HIV致使细胞毒T细胞的缺乏, 临床及病理可见肝细胞中缺乏HLA- I型的表达, 因此在艾滋病患者中尽管90%有HBV感染的血清学证据, 但只有少数HBsAg阳性者的肝组织呈现慢性活动性肝炎, 发生肝硬化者更罕见. 不少学者认为, HIV有可能导致原先的大多数慢性乙型肝炎患者的肝功能和组织学特征的改善; 也可使明显康复的急性乙型肝炎患者的HBV DNA激活, 使正在痊愈的慢性乙型肝炎复发, 促使HBsAg、HBeAg和HBV DNA滴度增加^[24]. 同性恋和静脉注射毒品成瘾的人群中, 首先感染HBV然后感染HIV者, 发生慢性肝炎和携带状态的趋势要比未感染HIV的患者大. 一旦HBV和HIV共同感染后, 肝脏症状和细胞溶解现象处于次要地位, 而艾滋病相关征象逐渐突出, 最后起主导地位, 从而提示HIV可使HBV转为慢性化, 而HBV可促使HIV难以根除, 并可加速艾滋病的临床症状恶化. HBV合并HIV感染者的结局不是死于肝衰竭和肝癌, 而是死于艾滋病, 特别是机会性感染.

3.2 治疗方案 慢性乙型肝炎重叠HIV感染后给治疗带来很大困难. 研究证实, HIV阴性的慢性乙型肝炎患者对几种抗病毒药物敏感, 但重叠感染时治疗方案的选择要兼顾两种病毒. 目前用于治疗HBV的药物有四种: interferon α , lamivudine(拉米夫定), adefovir(阿德福韦), entecavir(恩替卡韦). 其中lamivudine是一种核苷类逆转录酶抑制剂, 能同时抑制HBV和HIV的复制, 因此能安全有效的治疗HBV/HIV重叠感染的患者, 但由于其在长期治疗后出现HBV耐药株(YMDD变异)而受到限制. 对重叠感染者治疗2和4 a后耐药率分别达到50%和90%, 明显高于单独HBV感染组^[25]. 具有双重抗病毒作用的还有tenofovir(泰诺福韦)和emtricitabine(恩曲他滨), emtricitabine也可引起HBV耐药株的出现. 核酸类似物adefovir和tenofovir较lamivudine和emtricitabine不易产生耐药, 而且两类药物没有交叉耐药, 因此既可用于初治病人又可用于补救治疗. 高效抗逆转录病毒治疗方案HAART是目前HIV感染的重要治疗方法, 方案中部分药物可同时有效地治疗HBV感染, 因此HAART可治疗HBV/HIV重叠感染者. 单一用药HIV可快速产生耐药株, 因此必须采用联合治疗. 对于

■同行评价

文章全面而又有重点地综述了HBV与HIV重叠感染的流行病学、分子生物学机制及治疗方法, 观点明确、科学, 可读性强.

HBV/HIV重叠感染者, 如果在其HAART方案中已经包括lamivudine, 应考虑存在HBV耐药性的可能性, 运用emtricitabine是无效的, 应改用或加用tenofovir. 如果HIV的复制已经控制, 可以加用adefovir或entecavir^[26]. 这里重点提出的是对HBV/HIV重叠感染应进行早期防治, 这对提高生命质量和延长生存时间有重要意义. 流行病学的研究表明, HBV疫苗对未感染HIV的人群进行接种可能有益: 不仅减少HBV的感染率, 而且可减少发生艾滋病的机会. 血清抗-HIV阳性的免疫缺陷病毒携带者, 接受HBV疫苗后只有50%有不同程度的免疫反应; 当HIV感染后又感染HBV时, 疫苗的抗HBV作用经常是毫无反应的. 35名同性恋男性人群接种乙肝疫苗后, 在保护性HBsAb出现的时间内几乎全部HIV阴性. 因此对于有HIV和HBV感染潜在危险的所有年轻人及易感人群应尽早接种乙肝疫苗, 而且应该成为常规治疗方案, 尽可能早地选择接种时机^[27].

致谢: 感谢南开大学耿运琪教授给予的悉心指导和大力支持.

4 参考文献

- 童晓, 张晓燕, 钟卫州, 沈弢, 邵一鸣. HIV-1超感染的研究进展. 中国病毒学 2004; 19: 642-646
- 汪宁. 我国艾滋病预防控制的形势与面临的挑战. 中华预防医学杂志 2004; 38: 291-293
- Thio CL, Seaberg EC, Skolasky R Jr, Phair J, Visscher B, Munoz A, Thomas DL. Multicenter AIDS Cohort Study. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). *Lancet* 2002; 360: 1921-1926
- Shibayama T, Masuda G, Ajisawa A, Hiruma K, Tsuda F, Nishizawa T, Takahashi M, Okamoto H. Characterization of seven genotypes (A to E, G and H) of hepatitis B virus recovered from Japanese patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Med Virol* 2005; 76: 24-32
- Oronsaye FE, Oronsaye JI. Prevalence of HIV-positives and hepatitis B surface antigen-positives among donors in the University of Benin Teaching Hospital, Nigeria. *Trop Doct* 2004; 34: 159-160
- Sud A, Singh J, Dhiman RK, Wanchu A, Singh S, Chawla Y. Hepatitis B virus co-infection in HIV infected patients. *Trop Gastroenterol* 2001; 22: 90-92
- Heng BH, Goh KT, Chan R, Chew SK, Doraisingham S, Quek GH. Prevalence of hepatitis B virus (HBV) infection in Singapore men with sexually transmitted diseases and HIV infection: role of sexual transmission in a city state with intermediate HBV endemicity. *J Epidemiol Community Health* 1995; 49: 309-313
- 薛晓玲, 王哲. HIV感染者中HCV及HBV感染状况的研究. 中国性病艾滋病防治 1999; 5: 200-201
- 颜瑾, 林鹏, 曾常红, 王晔, 赵茜茜, 林恺生, 万卓越. 广东省1995-2001年HIV抗体阳性献血员合并HBV、HCV、梅毒感染状况调查. 华南预防医学 2003; 29: 20-22
- 董培玲, 李在村, 张可, 吴昊, 徐莲芝. 144例HIV/AIDS患者HCV、HBV感染分析. 中国公共卫生 2003; 19: 866
- 周志平, 张云晖, 聂为民. 抗-HIV阳性的有偿供血者HCV、HBV感染分析. 解放军医学杂志 2004; 29: 268
- Qadri I, Maguire HF, Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1003-1007
- 陶小红, 沈鼎明. 乙型肝炎病毒X蛋白对肝细胞癌生长因子激活作用的研究. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 161-163
- 杨益大, 村上清史. 乙型肝炎病毒X蛋白与RNA聚合酶II亚单位竞争结合转录因子II B的研究. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 15-17
- Robinson WS. The role of hepatitis B virus in development of primary hepatocellular carcinoma: Part II. *J Gastroenterol Hepatol* 1993; 8: 95-106
- Klaver B, Berkhout B. Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus. *J Virol* 1994; 68: 3830-3840
- 邓刚, 莎日娜, 母俊杰, 乔文涛, 耿运琪, 陈启民. JDV Tat反式激活LTR与HIV-1 Tat采用类似的细胞因子. 中国病毒学 2004; 19: 576-581
- Perkins ND, Edwards NL, Duckett CS, Agranoff AB, Schmid RM, Nabel GJ. A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J* 1993; 12: 3551-3558
- Sharp PA, Marciniak RA. HIV TAR: an RNA enhancer? *Cell* 1989; 59: 229-230
- Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 665-708
- 片山和宏, 阎辉. 乙型肝炎病毒X蛋白X抗体. 日本医学介绍 1989; 10: 126-127.
- Gomez-Gonzalo M, Carretero M, Rullas J, Lara-Pezzi E, Aramburu J, Berkhout B, Alcamí J, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein induces HIV-1 replication and transcription in synergy with T-cell activation signals: functional roles of NF-kappaB/NF-AT and SP1-binding sites in the HIV-1 long terminal repeat promoter. *J Biol Chem* 2001; 276: 35435-35443
- Laure F, Zagury D, Saimot AG, Gallo RC, Hahn BH, Brechot C. Hepatitis B virus DNA sequences in lymphoid cells from patients with AIDS and AIDS-related complex. *Science* 1985; 229: 561-563
- Thio CL, Netski DM, Myung J, Seaberg EC, Thomas DL. Changes in hepatitis B virus DNA levels with acute HIV infection. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1024-1029
- Locarnini S, Hatzakis A, Heathcote J, Keeffe EB, Liang TJ, Mutimer D, Pawlotsky JM, Zoulim F. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2004; 9: 679-693
- Nunez M, Soriano V. Management of patients co-infected with hepatitis B virus and HIV. *Lancet Infect Dis* 2005; 5: 374-382
- Reiss G, Keeffe EB. Review article: hepatitis vaccination in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 715-727

电编 李琪 编辑 潘伯荣

转化生长因子 β 1启动子区C-509T位点基因多态性与肝纤维化关系

黄玉波, 魏红山, 董庆鸣, 刘志英, 郭晶晶, 成军, 毛羽

黄玉波, 北京地坛医院肝炎一科 北京市 100011
魏红山, 董庆鸣, 刘志英, 郭晶晶, 成军, 毛羽, 北京地坛医院
传染病研究所 北京市 100011
北京市优秀人才培养专项经费资助课题, No. 20041D0301548
通讯作者: 魏红山, 100011, 北京市, 北京地坛医院传染病研究所. drliver@163.com
电话: 010-64211031-2359
收稿日期: 2006-01-25 接受日期: 2006-02-13

Polymorphism of C-509T at promoter region of transforming growth factor β 1 gene might be related to liver fibrosis

Yu-Bo Huang, Hong-Shan Wei, Qing-Ming Dong, Zhi-Ying Liu, Jing-Jing Guo, Jun Cheng, Yu Mao

Yu-Bo Huang, the First Department of Hepatitis, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Hong-Shan Wei, Qing-Ming Dong, Zhi-Ying Liu, Jing-Jing Guo, Jun Cheng, Yu Mao, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Supported by the Fund for Foster Excellent Talents of Beijing, No. 20041D0301548
Correspondence to: Hong-Shan Wei, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China. drliver@163.com
Received: 2006-01-25 Accepted: 2006-02-13

Abstract

AIM: To establish a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method to detect the polymorphism of C-509T at the promoter region of transforming growth factor (TGF) β 1 gene and explore its probable role in liver fibrosis.

METHODS: Patients with chronic hepatitis B ($n = 50$) and liver cirrhosis ($n = 46$) were involved in this study. A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was established. A set of primers was designed according to the promoter region of TGF- β 1 gene. Around C-509T was the enzyme digestion site for restriction endonuclease *Bsu*36 I. C or T was assured based on the enzymatic result of the polymerase chain reaction (PCR)

products.

RESULTS: Sequencing revealed 99% homogeneity between the two homozygous strains and the promoter region of TGF- β 1 gene. The anticipated mutations appeared at position C-509T. The CT genotype prevailed in both the hepatitis and the liver fibrosis patients. The frequency of CC genotype (28.3%) was higher than that (19.6%) of TT genotype in liver fibrosis patients while the frequency of TT genotype (22%) was higher than that (4%) of CC genotype in hepatitis patients. There were significant differences between all the groups ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The established method may be applied to detect the C-509T polymorphism at the promoter region of TGF- β 1 gene. The CC genotype may be involved in liver fibrosis.

Key Words: Polymerase chain reaction; Restriction fragment length polymorphism; Liver fibrosis; Transforming growth factor β 1

Huang YB, Wei HS, Dong QM, Liu ZY, Guo JJ, Cheng J, Mao Y. Polymorphism of C-509T at promoter region of transforming growth factor β 1 gene might be related to liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(11):1093-1096

摘要

目的: 建立多聚酶链式反应-限制性片段长度多态分析(PCR-RFLP)法检测转化生长因子 β 1(TGF- β 1)启动子区C-509T位点的变异并探讨其在肝纤维化中的作用。

方法: 根据TGF- β 1启动子区基因设计引物, 在C-509T位设计*Bsu*36 I酶切位点, 根据PCR产物酶切结果判断该位点为C或T。观察对象为慢性乙型肝炎患者50例, 乙型肝炎后肝硬化患者46例。

结果: 测序显示本文两株纯合子与TGF- β 1启动子区序列同源性在99%以上, 并在C-509T位点出现预期变异; 乙型肝炎和乙型肝炎后

■背景资料

TGF- β 可以刺激间质细胞分泌细胞外基质, 在组织纤维化发生过程中具有关键性调控作用。慢性乙型肝炎为我国最常见的传染病, 进展性肝纤维化是决定患者预后的关键因素之一。但TGF- β 基因多态性与HBV感染后肝硬化之间的关系仍未明确。

■研究前沿

目前的研究显示TGF- β 1基因有8个位点存在多态性,其中3个位于启动子区,3个位于编码区。编码区,如第25位密码子突变发现与HCV感染后肝纤维化发生有关,但非编码区多态性与纤维化相关资料缺乏。

肝硬化两组都是以CT基因型为主,但是肝硬化组CC基因型(28.3%)高于TT基因型(19.6%),而肝炎组TT基因型(22%)高于CC基因型(4%),几组之间有显著性差异($P<0.01$)。

结论: 本文建立的方法可用于TGF- β 1启动子区C-509T位点基因多态性的检测,该位点CC基因型可能与肝纤维化有关。

关键词: 多聚酶链式反应; 限制性片段长度多态性分析; 纤维化; 转化生长因子 β 1

黄玉波, 魏红山, 董庆鸣, 刘志英, 郭晶晶, 成军, 毛羽. 转化生长因子 β 1启动子区C-509T位点基因多态性与肝纤维化关系. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1093-1096

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1093.asp>

0 引言

近年研究表明, 转化生长因子 β (TGF- β)是与肝纤维化发病密切相关的关键细胞因子^[1-2], 而且可以通过刺激细胞外基质的合成并抑制其降解而促进肝纤维化的形成^[3-4]. TGF- β 1基因位于人类染色体19q13, 包含6个内含子和7个外显子, 他的启动子区有2个重要位点来启动转录并具有多种调节机制, 基因启动子区多态现象可引起转录异常, 从而影响疾病的产生或严重程度, C-509T位点是其中的一个^[5]. 而且C-509T基因多态性与血清中TGF- β 的浓度显著相关^[6]. 为此, 我们建立了多聚酶链式反应-限制性片段长度多态分析(PCR-RFLP)法检测C-509T位点的变异, 并探讨其在肝纤维化中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 观察对象为2004-06-12北京地坛医院住院的慢性乙型肝炎患者50例, 男女各25例, 年龄 35 ± 5 岁, 乙型肝炎后肝硬化患者46例, 男女各23例, 年龄 45 ± 6 岁. 病例的诊断标准符合2000年西安第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议制定的《病毒性肝炎防治方案》. Taq聚合酶为上海生工生物工程公司产品, 100 bp DNA ladder和*Bsu*36 I 内切酶为Promega公司产品, ReadyPCR™全血基因组DNA纯化系统为华美生物工程公司产品, 质粒提取采用Sigma公司GenElute Plasmid Miniprep Kit. PCR仪为ABI公司9700型. 根据设计引物, C-509T位点位于两个引物之间. 由北京赛百盛公司合成. 引物序列如下: P1: 5'-TGAGTGACAGGAGGCTGCTTA-3'; P2: 5'-AGAACGGAAGGAGAGTCAGGCT-3'.

扩增产物为257 bp.

1.2 方法 外周血白细胞基因组的提取, 采用华美生物工程公司ReadyPCR™全血基因组DNA纯化系统, 严格按照试剂盒说明书操作. PCR系统含 $10\times$ 缓冲液3 μ L, 25 mmol dNTPs 0.4 μ L, 25 μ mol/L P1和P2各0.5 μ L, Taq聚合酶2 U, 血清提取物4 μ L, 反应总体积为30 μ L. 循环条件: 94℃预变性3 min, 94℃ 20 s, 55℃ 20 s, 72℃ 30 s, 共35个循环, 最后, 72℃延伸7 min. 取扩增产物8 μ L经30 g/L琼脂糖凝胶(含1 g/L EB)电泳, 在198 bp处出现荧光带者为阳性. PCR产物酶切: *Bsu*36 I 酶切位点为CC'TNAGG, 如果C-509T位点为C, 则产生*Bsu*36 I 酶切位点, 如果为T, 则切不开. 取PCR产物8.5 μ L, $10\times$ 缓冲液D 1 μ L, *Bsu*36 I 0.5 μ L(5 U), 37℃酶切16 h. 取酶切产物10 μ L经30 g/L琼脂糖凝胶电泳, 只在198 bp处出现条带者为TT纯合子, 在108 bp和90 bp处出现条带者为CC纯合子, 在以上3个位置均有条带者TC杂合子. PCR产物的分子克隆与测序: 分别取CC纯合子(命名为DT-C-509)和TT纯合子(DT-509T)的PCR产物, 用低熔点琼脂糖凝胶电泳分离纯化, 直接与T-easy载体连接, 转化XL-1-Blue细菌, PCR筛选阳性克隆, 提取质粒, 采用通用引物, 经双脱氧链末端终止法进行双向测序(由上海申能博彩公司完成). DNA序列资料采用Vector NTI 9.0软件包及GeneDoc 2.6分析。

统计学处理 SPSS 10.0 for Windows软件包, 计数资料组间差异采用 χ^2 检验分析, $P<0.05$ 认为组间有显著差异。

2 结果

2.1 PCR产物酶切电泳结果 分别取CC纯合子、CT杂合子和TT纯合子阳性标本*Bsu*36 I 酶切产物各两份经30 g/L琼脂糖凝胶电泳, 结果与预期相符(图1)。

2.2 PCR产物克隆测序结果 将DT-C-509、DT-509T和TFG- β 1启动子区基因(GenBank注册号: J04431)相应序列进行比对发现, DT-C-509确为CC纯合子, DT-509T确为TT纯合子, 序列同源性在99%以上(图2)。

2.3 肝炎和肝硬化患者C-509T位点基因多态性比较结果 检测50例肝炎和46例肝硬化患者外周血白细胞基因组TGF- β 1启动子区C-509T位点多态性发现两组都是以CT基因型为主, 但是肝硬化组CC基因型(28.3%)高于TT基因型(19.6%),

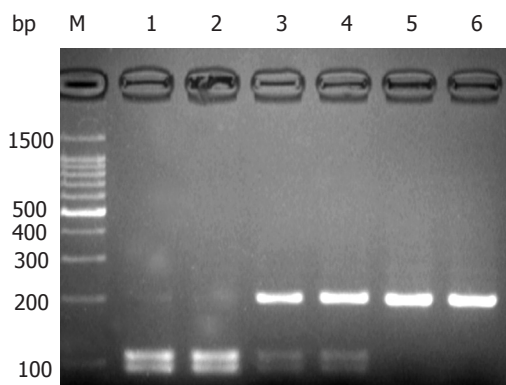


图 1 C-509T PCR扩增产物 $Bsu36$ I 酶切电泳结果. M: 100 bp DNA ladder; 1, 2: CC纯合子; 3, 4: CT杂合子; 5, 6: TT纯合子.

■相关报道
近期Drumm
*et al*报道TGF- β 1
基因启动子区
C-509T位点多态
性与囊性纤维化
发生显著相关.

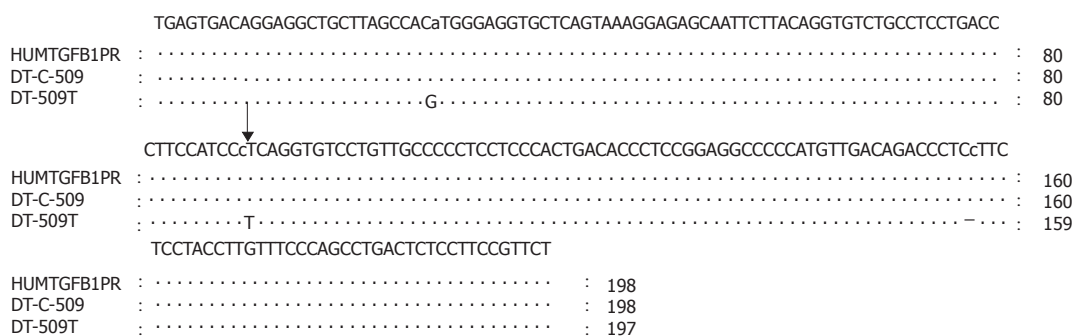


图 2 PCR产物克隆测序比较结果.

而肝炎组TT基因型(22%)高于CC基因型(4%), 几组之间有显著性差异($P < 0.01$). 但是等位基因两组间并未显示出有何差异($P > 0.05$, 表1).

3 讨论

慢性肝炎是我国的常见病, 威胁着很多人的健康, 大多数患者会发展成肝纤维化或肝硬化. 肝纤维化是指肝脏内纤维性结缔组织异常增生, 是一种“创伤愈合”的慢性渐进的病理过程, 其机制为细胞外基质(ECM)的合成与降解失调, 病理特征为胶原纤维生成及大量细胞外基质在disse间隙沉积. 他是肝硬化的早期阶段和必经阶段, 在一定情况下可被逆转, 但若病因持续存在, 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. ECM主要来源于肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC), HSC由正常静止状态被激活, 转变成肌成纤维细胞(myofibroblast-like cells, MFBs)和成纤维细胞(fibroblast), 是肝纤维化发生的中心环节. 研究表明, ECM的合成和降解过程很大程度上由TGF- β 1控制. TGF- β 1是细胞因子TGF- β 超家族成员之一, 最初是1970年代末从血小板中分离出来的, 因其能促进成纤维细胞的转化生长而得名. 在人体的结缔组

表 1 肝炎和肝硬化患者C-509T位点基因多态性比较结果

基因型	肝炎	肝硬化
CC	2 (4)	13 (28.3)
TT	11 (22)	9 (19.6)
CT	37 (74)	24 (52.2)
C等位基因	39 (44.8)	37 (52.9)
T等位基因	48 (55.2)	33 (47.1)

织、肝、肾、脑、皮肤、肌肉等组织都有其表达. 目前, TGF- β 至少有6种亚型, 在哺乳动物中只发现3种亚型. TGF- β 是一种有多重功能的细胞因子, 可以调节细胞增殖、分化、细胞外基质的产生、伤口愈合和组织修复^[7]. 多种器官纤维化、硬化、动脉粥样硬化等都与之有关. TGF- β 1活化后与细胞膜表面受体结合, 激活Smad蛋白并形成复合物, 由此转入核内, 与各种转录因子相结合, 从而调控基因转录. 但是TGF- β 1本身的表达也受其基因启动子区的调控. C-509T位点是其中的1个.

有研究表明, TGF- β 1基因调控区C-509T基因多态性与阿尔茨默病^[8]、浸润性乳腺癌、慢性牙周炎、哮喘、IgE增高、IgA肾病等多种疾病的发生或进展程度相关. 我们发现, 乙型肝炎和乙型肝炎后肝硬化患者C-509T位点都是以

■创新盘点

本研究对我国慢性HBV感染及HBV感染后肝硬化患者TGF- β 1基因启动子区C-509T位点多态性与肝硬化之间的可能关系进行了探讨。

CT基因型为主,但是肝硬化组CC基因型高于TT基因型,而肝炎组TT基因型高于CC基因型,但是等位基因两组间并未显示出有何差异。这与目前国内外研究结果较为一致。杨再兴 *et al*^[9]根据Child Pugh分级标准,将肝硬化人群分为A级、B级和C级,A级到C级肝硬化程度逐渐加重。结果发现,该位点的多态性与肝纤维化的严重程度存在相关性。CC基因型在Child-Pugh分级的C级组中的分布频率显著高于TT基因型。而且,在患者中,等位基因C以及基因型CC的分布频率随肝硬化程度的加重而升高。认为,该多态性影响肝硬化患者血浆中TGF- β 1的浓度,该位点等位基因C可能是影响肝硬化进展程度的一个重要的遗传因素。Kim *et al*^[10]发现在慢性乙型肝炎患者中C-509T位点TT或CT基因型发生肝细胞癌的危险性显著低于CC基因型。

总之,我们发现TGF- β 1基因调控区C-509T位点CC基因型可能与肝硬化有关,具体情况如何,还需要进行更大样本的临床流行病学研究。

4 参考文献

- 1 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
- 2 Shin JY, Hur W, Wang JS, Jang JW, Kim CW, Bae SH, Jang SK, Yang SH, Sung YC, Kwon OJ, Yoon SK. HCV core protein promotes liver fibrogenesis via up-regulation of CTGF with TGF- β 1. *Exp Mol Med* 2005; 37: 138-145
- 3 Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350-1358
- 4 Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J Clin Invest* 1992; 89: 19-27
- 5 Derynck R, Rhee L, Chen EY, Van Tilburg A. Intron-exon structure of the human transforming growth factor-beta precursor gene. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 3188-3189
- 6 Grainger DJ, Heathcote K, Chiano M, Snieder H, Kemp PR, Metcalfe JC, Carter ND, Spector TD. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 93-97
- 7 Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF- β 1 signals. *J Cell Sci* 2005; 118: 3573-3584
- 8 Luedeking EK, DeKosky ST, Mehdi H, Ganguli M, Kamboh MI. Analysis of genetic polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and the risk of Alzheimer's disease. *Hum Genet* 2000; 106: 565-569
- 9 杨再兴, 王皓, 万谟彬, 王晓今, 徐玲玲, 赵文静, 高春芳. TGF- β 1基因多态性对乙型肝炎纤维化的影响. 第二军医大学学报 2004; 25: 1288-1291
- 10 Kim YJ, Lee HS, Im JP, Min BH, Kim HD, Jeong JB, Yoon JH, Kim CY, Kim MS, Kim JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms with a hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Exp Mol Med* 2003; 35: 196-202

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议

本刊讯 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议将于2006-08在哈尔滨举行,现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文3 000字及摘要800字各1份,电脑打印(附软盘),2006-06-15截稿。

2 联系方式

哈尔滨市哈尔滨医科大学二院消化内科 刘冰熔 教授,电话: 13313695959, E-mail: liubingrong@medmail.com.cn.

转移特性不同的大肠癌细胞形貌结构的差异分析

余力, 刘莉, 张艳菲, 蔡颖谦, 李祖国, 丁彦青

余力, 南方医科大学珠江医院病理科 广东省广州市 510282
刘莉, 张艳菲, 李祖国, 丁彦青, 南方医科大学病理学教研室
广东省广州市 510515
蔡颖谦, 南方医科大学珠江医院神经外科 广东省广州市
510282
国家自然科学基金资助项目, No. 30370649
通讯作者: 丁彦青, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学病理
学教研室.
电话: 020-61642148 传真: 020-61642148
收稿日期: 2006-02-12 接受日期: 2006-03-03

Distinction analysis for variance of morphological architecture and different property of metastasis in human colorectal carcinoma cells

Li Yu, Li Liu, Yan-Fei Zhang, Ying-Qian Cai, Zu-Guo Li, Yan-Qing Ding

Li Yu, Department of Pathology, Zhujian Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Li Liu, Yan-Fei Zhang, Zu-Guo Li, Yan-Qing Ding, Department of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Ying-Qian Cai, Department of Neurosurgery, Zhujian Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30370649

Correspondence to: Dr. Yan-Qing Ding, Department of Pathology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Received: 2006-02-12 Accepted: 2006-03-03

Abstract

AIM: To investigate the correlation between the different property of metastasis and the variance of morphological architecture in human colorectal carcinoma (HCC) cell lines.

METHODS: The morphological architectures of three HCC cell lines with the identical genetic background and different property of metastasis, including SW620 (lymphatic metastasis), SW480 (hematogenous and lymphangitic metastasis) and SW480/M (hepatic metastasis), were observed by light microscopy and atomic force microscopy (AFM), and the expression of car-

cinoembryonic antigen (CEA), CD44v5, Fascin and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in those cell lines were detected by immunohistochemical method.

RESULTS: There were four types of cells, shaping as round-like, monopole, fibroblast-like, and giant, in all the three cell lines. In SW620 cell line, there were more fibroblast-like cells with many microvillus and pseudopodia on the cell surface and loose inter-cells conjunction. SW480/M consisted of round-like and monopole cells principally, which had the characteristics of epithelial differentiation. The cytoplasm margin was unclearly like plasmogamy and the specialized structure on cell membrane was unobvious. The morphology of SW480 cell was showed between SW620 and SW480/M. The level of CEA expression in all the three cell lines was lower. The expression of CD44v5 and PCNA in SW480/M were significantly higher than those in SW620 and SW480 (CD44v5: 26.023 ± 2.394 vs 10.554 ± 1.955 , 14.411 ± 4.826 , $P < 0.001$; PCNA: 93% vs 40%, 37%, $P < 0.001$). The expression of fascin in SW620 was significantly higher than that in SW480/M (26.507 ± 2.471 vs 19.157 ± 3.563 , $P < 0.05$). However, fascin expression was not markedly different between SW620 and SW480.

CONCLUSION: Morphological architecture and immunophenotypes are different in the three types of cultivated cells, which may be related to their property of metastasis.

Key Words: Atomic force microscope; Colorectal carcinoma; Cell lines; Morphological architecture; Metastasis

Yu L, Liu L, Zhang YF, Cai YQ, Li ZG, Ding YQ. Distinction analysis for variance of morphological architecture and different property of metastasis in human colorectal carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(11):1097-1102

摘要

目的: 探讨不同大肠癌细胞株的形貌结构差异与其转移特性的相关性。

■背景资料

大肠癌术后局部复发与继发的淋巴道转移、肝转移仍是严重威胁患者生命的主要因素,许多研究表明大肠癌的组织细胞形态、侵袭生长方式和免疫表型等与肿瘤转移的部位有关,作为研究转移机制常用的不同转移潜能的肿瘤细胞系,由于癌细胞存在膜表面分子种类和数量等的差异,其超微结构的形貌也必然存在或多或少的差异。

■创新盘点

本文应用光镜和最新的表面成像技术-AMF对培养同一亲本,分别具有不同转移特性的SW620(淋巴道转移)、SW480(血道和淋巴道转移)、SW480/M(肝转移)大肠癌细胞进行了形态和表面超微结构观测.发现这3种细胞存在形态结构的不同,从形态学角度分析了形貌结构的差异与转移特性的相关性,为大肠癌转移机制的研究提供新的线索.

方法: 对3种遗传背景一致,具有不同转移特性的大肠癌细胞株SW620(淋巴道转移)、SW480(血道和淋巴道转移)SW480/M(肝转移)细胞的形态结构进行原子力显微镜和光镜观察,以及应用免疫组化技术检测CEA、CD44、Fascin、PCNA在3种细胞的表达.

结果: 3个细胞系主要由4种形态细胞构成,包括类圆形细胞、单极细胞、纤维母细胞样细胞及瘤巨细胞. SW620瘤细胞纤维母细胞样细胞较多,表面有较多的微细绒毛和细长胞突,瘤细胞间黏附不紧密. SW480/M细胞具有上皮细胞分化的特点,主要由类圆形和单极细胞构成,细胞与细胞连接紧密,胞质融合,细胞膜表面特化结构不明显. SW480细胞形态介于SW620和SW480/M之间. CEA在3种细胞均低表达; CD44和PCNA在SW480/M的表达强度明显高于SW620和SW480,差异显著($CD44v5: 26.023 \pm 2.394$ vs 10.554 ± 1.955 , 14.411 ± 4.826 , $P < 0.001$; PCNA: 93% vs 37% , 40% , $P < 0.001$), Fascin表达在SW620与SW480/MS之间差异明显(26.507 ± 2.471 vs 19.157 ± 3.563 , $P < 0.05$),而在SW620和SW480之间无差异.

结论: 3种大肠癌细胞固有的表面形貌和免疫表型存在差异,可能与肿瘤细胞转移特性有关.

关键词: 原子力显微镜; 结直肠癌; 细胞系; 形态结构; 转移

余力, 刘莉, 张艳菲, 蔡颖谦, 李祖国, 丁彦青. 转移特性不同的大肠癌细胞形貌结构的差异分析. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1097-1102

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1097.asp>

0 引言

虽然目前大肠癌的治疗手段和患者的预后有较大的改善,但术后局部复发与继发的淋巴道转移、肝转移仍是严重威胁患者生命的主要因素^[1]. 大肠癌的发生、发展是多步骤、多种因素参与的极复杂过程. 不同转移潜能的肿瘤细胞系是研究转移机制的常用的模型,通过比较细胞形态、生物学特性、表达基因及蛋白差异等,可探讨其与侵袭、转移的关系和作用机制. 由于不同转移特性癌细胞存在膜表面分子种类和数量等的差异,其超微结构的形貌也必然存在或多或少的差异. 为此我们对同一亲本,分别具有不同转移特性3种人大肠癌细胞株进行了形貌结构的观察,以求从形态学角度探讨常规培养

条件下肿瘤细胞的原始的形貌差异与其转移特性的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 SW620、SW480和SW480/M人大肠癌细胞株来自同一亲本,遗传背景一致,分别具有不同转移潜能. SW620(ATCC号: CCL227)具有高选择淋巴道转移的特性, SW480(ATCC号: CCL228)血道和淋巴道转移, SW480/M是南方医科大学肿瘤研究所用体内连续传代方法,以SW480细胞株在裸鼠盲肠反复接种,筛选获得的具有高选择肝脏转移特性的亚系.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 先将盖玻片等分成4块,用纯水反复冲洗,高压消毒后,置入6孔培养板中待用;载玻片用1 g/L多聚赖氨酸包被晾干、高温消毒后备用. 将3种人大肠癌细胞株悬液接种在培养板中盖玻片和湿盒内的载玻片上,50 mL/L CO₂、37℃进行常规培养. 培养基为RPMI 1 640和100 mL/L小牛血清,24 h后更换1次培养液,2 d后取出待用.

1.2.2 标本处理和形态学观察 长有细胞载玻片用PBS轻洗两遍后25 g/L戊二醛固定20 min, PBS轻洗后,常规HE染色及免疫组化检测,光镜观察. 另将载有细胞的盖玻片用PBS轻洗2遍,用25 g/L戊二醛固定20 min,用PBS和纯水各轻洗晾干后置于原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)内观察. AFM型号SPM-9500J3(岛津公司,日本),接触模式,悬臂弹性系数2 N/m,针尖曲率半径为20 nm,水平最大扫描范围为125 μm × 125 μm. 先应用附带光镜随机找到肿瘤细胞,移动针尖至扫描范围内,接触压力调整后对细胞膜表面进行3 000-10 000倍分辨率的三维形貌逐层扫描检测,利用随机附带分析软件对细胞的形态、细胞表面粗糙度(Ra)等指标进行分析.

1.2.3 免疫组化检测 鼠抗人CEA、CD44、Fascin、PCNA即用型单克隆抗体以及SP试剂盒均购自福建迈新生物有限公司. 磷酸盐高压抗原修复, SP法染色,染色操作步骤按照试剂盒说明书进行,以PBS替代一抗设立阴性对照,以已知的阳性组织片作为阳性对照. 免疫组化结果判定, CEA、CD44、Fascin阳性细胞棕黄色颗粒定位于细胞质或细胞膜, PCNA阳性定位于细胞核;应用CMIAS图像分析系统免疫组化测量模块,测量CEA、CD44、Fascin阳性细胞的阳性值(PU值): 每个细胞系随机选择7个高倍视野,每个视野描

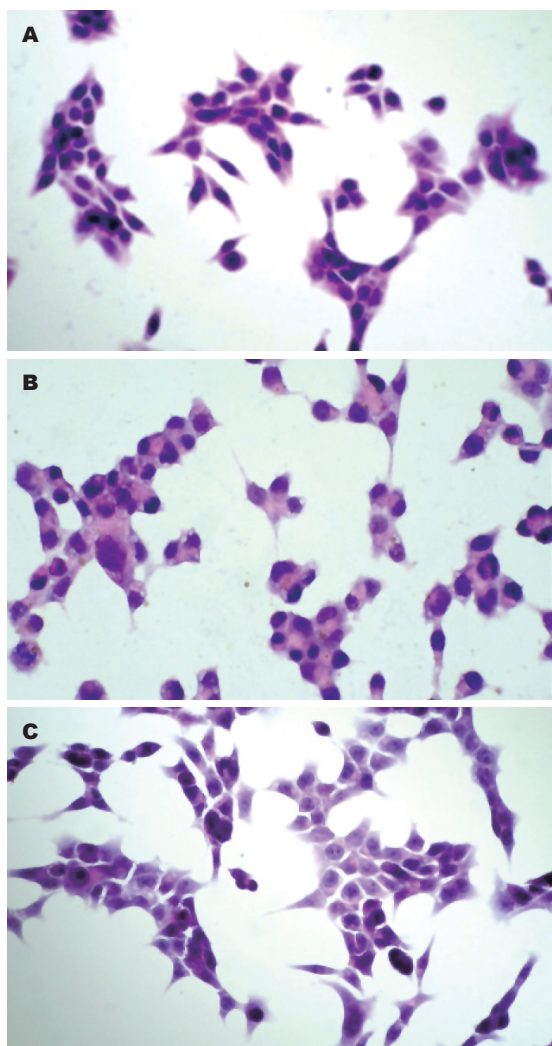


图1 3种大肠癌细胞光镜下形态. A: SW620细胞簇状分布, 纤维母细胞样细胞较多, 细胞界限清; B: SW480/M细胞簇状或链状分布, 细胞界限不清; C: SW480细胞形态与SW620类似, 有核仁类圆形细胞较多.

记测量不少于20个阳性细胞. PCNA在高倍视野下计数200个细胞, 计算阳性细胞数, 换算为阳性百分比.

统计学处理 使用SPSS10.0专业软件, 应用统计学方法包括 t 检验, χ^2 检验等, 结果以mean \pm SD表示.

2 结果

2.1 光镜观察 三个细胞系载玻片上细胞形态主要为四种类型: (1)纤维母细胞样(双极)细胞, 细胞核椭圆形, 胞突尖细; (2)类圆形细胞, 细胞核圆形淡染, 有1-2个核仁; (3)单极细胞, 细胞核圆形浓染, 偏位, 一极有尖细的胞质; (4)瘤巨细胞, 细胞核大, 畸形浓染, 胞质丰富, 淡红染. SW620细胞成簇平铺分布, 排列错落有致, 细胞界限清, 细胞簇中央为类圆形细胞, 周边有较多的纤维

母细胞样细胞, 散在或相互胞突相连形成链状(图1A). SW480/M细胞集聚成簇或呈链状分布, 细胞与细胞连接紧密、界限不清呈融合状, 单极细胞位于周边, 胞突细长(图1B), 纤维母细胞样细胞罕见. SW480细胞分布与排列与SW620细胞类似, 但具有核仁的类圆形细胞明显比SW620多, 部分区域细胞间界限不清呈融合状(图1C). 三个细胞系均见有瘤巨细胞散在分布, 以SW480/M最多, 核分裂相易见.

2.2 AFM扫描成像 可见多个成簇排列的肿瘤细胞, 相邻细胞存在明确的连接缝隙或紧密连接呈融合状, 连接缝隙处可以清晰地观察到胞质伸出的细丝状或片状的连接物质或缝隙不明显融合状. 纤维母细胞样细胞多呈游离状, 其纵轴长径约30 μm , 横径为8.49 μm , 表面有较多的微细绒毛, 两端可见较粗的伪足, 呈卷曲状, 逐渐变细呈绒毯状附着于玻片上; 纤维母细胞样细胞与其他细胞之间可见伸出的伪足相连或灶性紧密相连(图2A). 类圆形细胞直径约为11 μm , 表面微细绒毛稀疏, 可见粗短胞突; RA值(nm, 平均值): 纤维母细胞样细胞2100, 单极细胞1116, 类圆形细胞为183. SW620纤维母细胞样细胞多见, 细胞与细胞连接缝隙清晰, 有局灶的胞质融合. SW480/M细胞集聚层叠, 细胞与细胞连接紧密, 连接处胞质融合, 表面微细绒毛不明显(图2B). SW480细胞表面微细绒毛相对SW620密度减少, 细胞与细胞连接缝隙模糊, 有灶片状的胞质融合(图2C). 3种细胞株形态和测量参数比较(表1).

2.3 免疫组织化学观察 PCNA在SW480、SW620和SW480/M的表达阳性率分别是37%、40%和93%, SW480/M与其他2组比较差异显著($P<0.001$); CEA、CD44、Fascin的表达结果(表2). CEA表达值在3个细胞系弱表达, 3组之间两两比较有差异($P<0.05$), 以SW480/M表达最强; Fascin在SW480、SW620的表达无差异, 以SW620表达最强, 与SW480/M比较差异明显($P<0.05$); CD44在3组之间两两比较有差异($P<0.05$), 在SW480/M的表达强度明显高于SW480和SW620, 差异显著($P<0.001$).

3 讨论

癌细胞运动能力是癌细胞转移的基础, 细胞表面结构的改变、细胞膜的凸起和伪足形成与细胞黏附、渗透压的变化以及细胞固有的骨架结构等有关, 在细胞靶向性移动中具有重要作用,

■同行评价

本文应用光镜和最新的表面成像技术-原子力显微镜技术对培养的三大肠癌细胞系进行了形态和表面超微结构观测, 发现同一亲本, 遗传背景一致, 分别具有不同转移特性的大肠癌细胞具有不同的形态特点, 并分析了其间的关系. 研究方法科学, 形态观察细致, 结果分析可信.

表 1 3种细胞形貌结构和测量参数比较

细胞系	细胞密度	细胞间连接	胞突	微绒毛	RA值 (nm, mean \pm SD)	
					变形细胞	类圆形细胞
SW480	较密	缝隙模糊、胞质灶片状融合	中等	中等	1577.921 \pm 784.296 ^b	68.107 \pm 24.015 ^c
SW620	稀疏	缝隙清、胞质局灶融合	粗长	浓密	1978.344 \pm 503.982 ^a	210.380 \pm 59.433 ^c
SW480/M	密	缝隙模糊、胞质融合紧密	粗短	不明显	1107.390 \pm 276.808 ^{ab}	273.041 \pm 60.548 ^c

^{ab} $P < 0.05$, ^c $P < 0.05$.

表 2 3个细胞系的CEA、CD44和Fascin表达结果 (PU值mean \pm SD)

细胞系	CEA	CD44	Fascin
SW480	4.936 \pm 1.004	14.411 \pm 4.826	27.267 \pm 6.070
SW620	3.350 \pm 0.760	10.554 \pm 1.955	26.507 \pm 2.471
SW480/M	6.399 \pm 2.069	26.023 \pm 2.394	19.157 \pm 3.563

多组比较 $P < 0.05$.

是癌细胞侵袭转移的形态学基础^[2]. 由于肿瘤细胞黏附、扩散、迁移依赖于与细胞外基质接触的动态形成和松解, 因附着基质成分不同, 细胞形态变化不同^[3], 来源于同一个体结肠癌不同亚系细胞, 虽然在倍增时间、染色体数目、染色体缺陷相似, 但细胞表面表达黏附分子不同, 体外培养的细胞形态和侵袭和转移能力也存在差异^[4]. 因此, 本实验为保持细胞的原始状态, 我们采用多聚赖氨酸包被的玻片^[5]和无任何处理载玻片作为培养细胞的附着物, 使黏附对细胞的形态影响减低到最小程度. 在此条件下对同源性不同细胞株固有的细胞形貌特征观察可以一定程度上了解癌细胞的形态与转移特性的相关性. 同时, 为了了解细胞的基本状态, 我们对3个细胞系进行了CEA、CD44、Fascin、PCNA免疫组化定量检测. 结果表明, 作为细胞分化指标CEA在3种细胞低表达, 说明细胞分化程度均较低^[10]; CD44和PCNA在SW480/M的表达显著高于另外两种细胞, 具有高增殖活性和与周围细胞或基质的黏附能力, 说明SW480/M细胞更具有侵袭性^[6-7].

许多研究表明大肠癌的组织细胞形态、侵袭生长方式和免疫表型等与肿瘤转移的部位有关^[8], 为了解肿瘤细胞固有的形貌结构与器官转移特性的相关性, 我们应用光镜和最新的表面成像技术-AMF对培养同一亲本, 分别具有不同

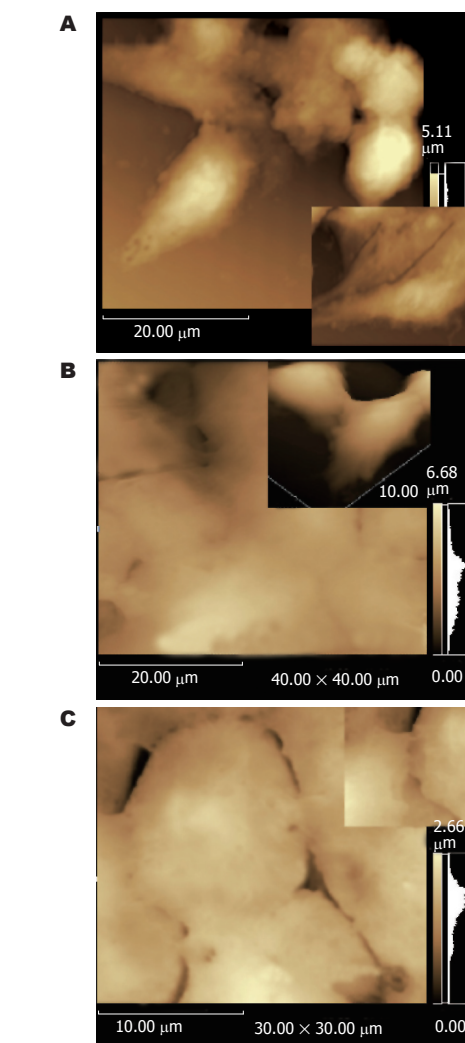


图 2 3种大肠癌细胞原子力显微镜下形态. A: SW620纤维母细胞样细胞有较多的微细绒毛及较粗的伪足, 细胞之间连接缝隙清晰, 有局灶的胞质融合; B: SW480/M细胞之间连接紧密, 胞质融合; C: SW480细胞之间连接缝隙清晰, 可见胞质伸出的细丝状或片状的连接物质, 有局灶的胞质融合.

转移特性的SW620、SW480和SW480/M大肠癌细胞进行了形态和表面超微结构观测. 结果显示3个细胞系细胞各具有不同形态特点, 构成的细胞形态多样, 从类圆形细胞、单极细胞到纤维母细胞样细胞, 微细绒毛、伪足形成数量明

显增多, 测量Ra值在变形细胞明显大于类圆形细胞, 达5-50倍, 以纤维母细胞样细胞为最大; 类圆形细胞中, Ra值SW480/M细胞明显高于其余2种细胞. Ra值是指样品表面上具有较小间距的峰谷所组成的微观集合形状特性, Ra值越小, 被测表面越光滑, 反之, Ra值越大, 被测表面越粗糙, Ra值可作为描述细胞表面形貌特性的指标, 其形成原因很可能是膜表面蛋白单体、聚集体, 以及膜表面的突起和微绒毛等特化结构所致^[9]. 说明同源性细胞系不同形态的细胞的形成很可能是细胞生长分化不同阶段的结果. 而同一细胞系的不同亚系细胞的形态不同, 其表型及迁移能力不同, Solimene *et al*^[10]观察大肠癌肝转移筛选出的LISP-I细胞系内的亚系细胞形态和行为特征的关系, LISP-A10细胞表现出上皮分化且表达CEA和桥粒核心糖蛋白, LISP-E11为纤维母细胞样, 低地表达CEA; 与层黏蛋白和纤维连接素的黏附作用和移动趋向性, LISP-E11高于LISP-A10. 说明同一细胞系存在细胞转移能力的异质性. Kubens *et al*^[11]对活体大肠癌细胞的观察发现自发移动的细胞都具有伸长胞突的细胞, 而不活动的细胞为圆形, 提示变形瘤细胞变异越大, 特别是纤维母细胞样细胞, 迁移能力越强,

肿瘤的特异性转移是一个非随机事件, 依赖于特定的肿瘤细胞与特定的组织或器官提供的生长环境并与之相适应^[12-13], 在同源性肿瘤细胞之间存在黏附内皮和实质细胞能力的差异, 对器官特异生长因子和抑制因子的反应存在差异^[14]. SW480/M是具有高选择肝脏转移特性的亚细胞系, 形态特征是类圆细胞, 细胞与细胞连接紧密, 胞质融合, 细胞膜表面特化结构不明显, 提示瘤细胞自发运动的能力低且细胞之间黏附紧, 具有上皮细胞分化的特点. 单从形态特点来看, SW480/M不具备肿瘤细胞侵袭运动的形态基础. 但由于SW480/M高表达CD44, 在肿瘤生长过程中能够连接细胞外基质成分, 通过与细胞骨架蛋白相结合, 参与细胞伪足的形成, 引起细胞的形态和游动性改变, 易于与血管内皮黏附, 促进浸润和转移^[15-16]. 袁辉生 *et al*^[17]临床研究发现高分化大肠癌的肝转移率比低分化癌高, 认为高分化癌尽管恶性度低, 但就肝转移而言, 并不意味着其预后较好, 究其原因可能是低分化癌脱落的肿瘤细胞浸润能力、运动力均强, 常呈单个状态进入肝脏, 易被肝脏的Kupffer细胞所吞噬, 而高分化癌的肿瘤脱落多呈瘤栓状, 可嵌在肝窦中, 形成肝转移. 这个结果可以解释

SW480/M细胞之间黏附紧密的形态特点. 依据SW480/M细胞的转移特性, 其侵袭转移方式可能为瘤组织侵袭破坏静脉, 成片细胞脱落进入血道, 进而与血管黏附、侵袭和着床生长而发生肝转移.

Fascin是一种50-55 kDa的细胞骨架蛋白, 可与F-肌动蛋白结合, 定位于细胞质张力纤维和细胞膜皱褶边缘的丝状伪足、微棘的核心肌动蛋白束中, Fascin的高表达引起胞膜表面突起增多, 肌动蛋白骨架重建, 细胞运动性增强, 细胞侵袭能力增加^[18-19]. SW620细胞具有较高的淋巴结转移的选择性, Fascin表达增高, 其形态特点是瘤细胞变形明显, 纤维母细胞样细胞多, 形成的细胞伪足明显, 提示细胞阿米巴运动能力较强; CD44表达较低提示瘤细胞间黏附不紧, 可使癌细胞失去“束缚”, 获得一定的“自由”, 易于脱离癌细胞团, 说明大肠癌的淋巴道转移与细胞的自身运动能力明显相关, 癌细胞可通过主动侵蚀、变形进入淋巴管, 导致淋巴结转移. SW480细胞形态特征和免疫表型介于SW620和SW480/M之间, 兼具有两者的形态特点, 提示其瘤细胞异质性明显, 而易形成淋巴和血道转移.

4 参考文献

- 1 Chedid AD, Villwock Mde M, Chedid MF, Rohde L. Prognostic factors following liver resection for hepatic metastases from colorectal cancer. *Arg Gastroenterol* 2003; 40: 159-165
- 2 You J, Aznavoorian S, Liotta LA, Dong C. Responses of tumor cell pseudopod protrusion to changes in medium osmolality. *J Cell Physiol* 1996; 167: 156-163
- 3 Lehnert D, Wehrle-Haller B, David C, Weiland U, Ballestrem C, Imhof BA, Bastmeyer M. Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J Cell Sci* 2004; 117: 41-52
- 4 Kotanagi H, Saito Y, Yoshioka T, Koyama K. Characteristics of two cancer cell lines derived from metastatic foci in liver and peritoneum of a patient with colon cancer. *J Gastroenterol* 1998; 33: 842-849
- 5 McElfresh M, Baesu E, Balhorn R, Belak J, Allen MJ, Rudd RE. Combining constitutive materials modeling with atomic force microscopy to understand the mechanical properties of living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 6493-6497
- 6 Hanley WD, Napier SL, Burdick MM, Schnaar RL, Sackstein R, Konstantopoulos K. Variant isoforms of CD44 are P- and L-selectin ligands on colon carcinoma cells. *FASEB J* 2006; 20: 337-339
- 7 Karadag A, Fedarko NS, Fisher LW. Dentin matrix protein 1 enhances invasion potential of colon cancer cells by bridging matrix metalloproteinase-9 to integrins and CD44. *Cancer Res* 2005; 65: 11545-11552
- 8 Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato

- K. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1432-1435
- 9 Bolshakova AV, Kiselyova OI, Filonov AS, Frolova OY, Lyubchenko YL, Yaminsky IV. Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy* 2001; 86: 121-128
- 10 Solimene AC, Carneiro CR, Melati I, Lopes JD. Functional differences between two morphologically distinct cell subpopulations within a human colorectal carcinoma cell line. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 653-661
- 11 Kubens BS, Zanker KS. Differences in the migration capacity of primary human colon carcinoma cells (SW480) and their lymph node metastatic derivatives (SW620). *Cancer Lett* 1998; 131: 55-64
- 12 Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 33-45
- 13 Kopfstein L, Christofori G. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 449-468
- 14 Vogel I, Shen Y, Soeth E, Juhl H, Kremer B, Kalthoff H, Henne-Bruns D. A human carcinoma model in athymic rats reflecting solid and disseminated colorectal metastases. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383: 466-473
- 15 徐钊, 张霞, 房殿春, 晋华源, 罗元辉, 阎晓初, 王东旭. 结肠癌患者癌组织中CD44v6和Ⅳ型胶原的表达及血清中HA和Ⅳ型胶原的定量检测. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2312-2315
- 16 丁志杰, 单吉贤, 都姝妍. 直肠癌组织CD44v6, DNA含量的联合检测及临床意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1382-1384
- 17 袁辉生, 程石, 俞巍, 巢仰云, 张越巍. 大肠癌同期肝转移相关危险因素分析. *基础医学与临床* 2002; 22: 333-335
- 18 Buda A, Pignatelli M. Cytoskeletal network in colon cancer: from genes to clinical application. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 759-765
- 19 Jawhari AU, Buda A, Jenkins M, Shehzad K, Sarraf C, Noda M, Farthing MJ, Pignatelli M, Adams JC. Fascin, an actin-bundling protein, modulates colonic epithelial cell invasiveness and differentiation *in vitro*. *Am J Pathol* 2003; 162: 69-80

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006广州肝病防治研究新进展学术报告会

本刊讯 2006广州肝病防治研究新进展学术报告会将于2006-07-01/05在广州举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求

要求摘要和正文各一份, 并附软盘或寄到电子信箱.

2 联系方式

广州市广州大道北1838号南文医科大学南方医院消化病研究所(510515), 白岚教授 收. 电话: 020-61641658;

E-mail: gdsgzbxbh@163.com.

间接ELISA法对*H pylori*免疫牛初乳中抗体的检测

周冬仁, 王 锋, 张常印, 崔 山, 唐泰山, 偶 健

周冬仁, 王锋, 崔山, 偶健, 南京农业大学动物科技学院 江苏省南京市 210095
张常印, 唐泰山, 江苏省出入境检验检疫局动检实验室 江苏省南京市 210001
江苏省国际合作项目, No. BZ2005041
通讯作者: 王锋, 210095, 江苏省南京市, 南京农业大学动物科技学院. f_wang2001@sina.com
收稿日期: 2006-01-10 接受日期: 2006-02-09

Indirect ELISA in detection of antibodies in colostrums of the cows immunized with *Helicobacter pylori*

Dong-Ren Zhou, Feng Wang, Chang-Yin Zhang, Shan Cui, Tai-Shan Tang, Jian Ou

Dong-Ren Zhou, Feng Wang, Shan Cui, Jian Ou, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China
Chang-Yin Zhang, Tai-Shan Tang, Laboratory of Animal Quarantine, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China
Supported by the International Cooperation Project of Jiangsu Province, No. BZ2005041
Correspondence to: Feng Wang, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China. f_wang2001@sina.com
Received: 2006-01-10 Accepted: 2006-02-09

Abstract

AIM: To observe the changes of specific antibodies in the cow colostrums by indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

METHODS: Two pregnant cows (non-parous and parous) were immunized with *H pylori* whole-cell antigen (4×10^9 CFU) via intramuscular injection in the neck. The colostrums were collected with 7 days after parturition.

RESULTS: *H pylori* induced significant immune responses in both cows, and the efficacy of anti-*H pylori* in the parous cow reached the peak values (5.84) at the first day after parturition, which was significantly higher than that in the non-parous cows (3.51, $P < 0.05$). However, the efficacies dropped quickly with 7 days. Weak positive anti-*H pylori* were observed only at the

first day in the control cow.

CONCLUSION: The immune response is superior in the parous cow to that in the non-parous one.

Key Words: Indirect ELISA; *Helicobacter pylori*; Colostrums

Zhou DR, Wang F, Zhang CY, Cui S, Tang TS, Ou J. Indirect ELISA in detection of antibodies in colostrums of the cows immunized with *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(11):1103-1106

摘要

目的: 建立间接ELISA法测定牛初乳中*H pylori*抗体的水平, 并观察特异性抗体的产生规律。

方法: 本试验以*H pylori*全菌抗原免疫妊娠母牛, 每头牛每次肌肉注射 4×10^9 CFU全菌抗原, 收集分娩后7 d内的初乳。以间接ELISA法检测其中*H pylori*抗体水平。

结果: *H pylori*能有效地引起免疫应答, 成年牛初乳中的抗体效价在分娩当天达到最大值5.84, 高于青年牛的3.51($P < 0.05$), 随后迅速下降。对照奶牛仅在分娩当天检测到微弱阳性。

结论: 成年牛的对*H pylori*的免疫应答好于青年牛。

关键词: 间接ELISA; 幽门螺杆菌; 初乳

周冬仁, 王锋, 张常印, 崔山, 唐泰山, 偶健. 间接ELISA法对*H pylori*免疫牛初乳中抗体的检测. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1103-1106
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1103.asp>

0 引言

自1982年Warren和Marshall首先从人类胃黏膜中培养出幽门螺杆菌(*H pylori*)以来, 大量研究证实*H pylori*感染是慢性活动性胃炎、消化性溃疡的主要病因, 已严重威胁着人类的健康^[1-4]。抗生素

■背景资料

在我国, 关于免疫乳概念的引进及免疫乳的研究始于1990年代, 现在这一概念已被乳品行业所接受。免疫乳抗体的被动传递用于治疗胃肠道疾病, 是这些疾病免疫治疗方面的一个新的思路。本文利用间接ELISA方法对免疫后的血清及初乳进行检测, 旨在研究其特异性抗体的产生规律, 为制备高含量的抗*H pylori*免疫乳制品及相关生物制品提供技术依据。

■同行评价

本文利用间接ELISA方法对免疫后的血清及初乳进行检测,旨在探索其特异性抗体的产生规律,为制备高含量的抗*H pylori*免疫乳制品及相关生物制品提供技术依据,为临床应用被动免疫方法*H pylori*相关胃肠疾病提供了一个新的思路,具有科学性 & 可读性。

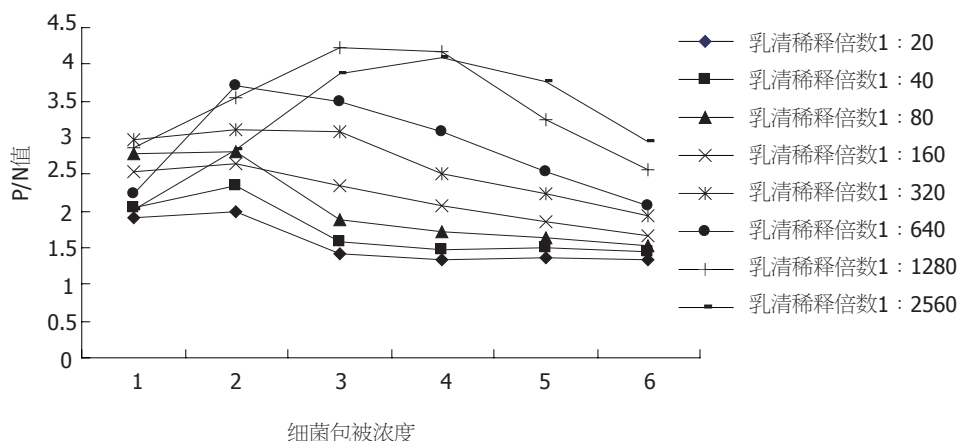


图1 细菌最适包被浓度和乳清稀释度的选择。

联合疗法是目前常用的方法,但耐药菌株的不断出现和治愈后的复发给治疗增加了难度^[5]。在疫苗的研制方面,虽取得了很大进展,但在免疫原、佐剂、免疫途径等细节问题上还没有完善,目前还无法用于实际应用^[6-7]。因此,许多学者将注意力转移到通过人工被动免疫来防治胃肠道疾病,可望利用多克隆抗体的被动传递或单克隆抗体的局部应用来预防和治疗*H pylori*引起的慢性胃炎与胃、十二指肠溃疡。免疫乳抗体的被动传递用于治疗胃肠疾病,是这些疾病免疫治疗方面的一个新的思路。我们利用间接ELISA方法对免疫后的血清及初乳进行检测,旨在研究其特异性抗体的产生规律,为制备高含量的抗*H pylori*免疫乳制品及相关生物制品提供技术依据^[8-10]。

1 材料和方法

1.1 材料 国际标准菌株NCTC11637,购于上海消化道疾病研究所。培养基为含有马血清60 mL/L,盐酸万古霉素10 g/L,两性霉素B 10 g/L,多黏菌素B 0.5 g/L,甲氧苄胺嘧啶0.5 g/L的哥伦比亚固体培养基。37℃,微需氧条件下培养72 h^[11]。妊娠后期的3头奶牛,选自江苏省泰州市卫岗奶牛场。

1.2 方法 第1次免疫为分娩前42 d,取2 mL灭活菌液用等体积弗氏完全佐剂(购于Sigma公司)充分乳化后于颈部皮下多点注射,每次菌量为 4×10^9 CFU/头。以后改用弗氏不完全佐剂乳化,分别在分娩前28, 17, 7 d进行3次免疫,菌量如上。其中一头为对照组。第1次采集血样为分娩前42 d,以后每隔1 wk采集1次血样,分离血清分装后置于-20℃保存备用。第1次采集乳样为分娩后8 h,以后每隔8 h采集1次,连续采7 d,以上样本采集后置于-20℃保存备用。将采集的乳样于室温解冻后,取20 mL于试管中加入凝乳酶,37℃静置2 h后,2500 r/min离心15 min,取上层清亮乳清

置于-20℃保存备用。取聚苯乙烯96孔ELISA板,每孔加入12.5 g/L的戊二醛溶液200 μL,37℃温育2 h。取出后,在洗板机上用蒸馏水洗涤3次,每次300 μL。将灭活的菌液用包被液(0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液)稀释至 5×10^{11} CFU/L,每孔加入50 μL,37℃温育20-24 h。每孔加入220 μL封闭液(1 g/L BSA),4℃过夜。之后,用洗涤液(0.5 g/L Tween-20)洗涤三次,每次300 μL,干燥。至此,ELISA板可放在-20℃保存备用。将待检样本用封闭液稀释至所需浓度,每孔加入50 μL,37℃温育1 h,用洗涤液洗板3次,每次300 μL。用酶标抗体稀释液(10 g/L BSA)将酶标兔抗牛IgG抗体(购于Sigma公司)1:2×10⁴稀释,每孔加入50 μL,37℃温育1 h,用洗涤液洗板3次,每次300 μL。每孔加入100 μL底物显色液(OPD-H₂O₂溶液),室温避光反应20 min。每孔加入50 μL终止液终止反应。在酶标仪上用490 nm和620 nm双波长测定每孔的吸光度(A)值。

2 结果

2.1 细菌最适包被浓度和乳清稀释度 用方阵滴定法:细菌浓度作 $0.3125-40 \times 10^{11}$ CFU/L倍比稀释,乳清作1:20-2560倍比稀释。可见在酶标兔抗牛IgG抗体工作浓度为1:20 000条件下,细菌浓度为 5×10^{11} CFU/L时P/N值最高(图1),故选用 5×10^{11} CFU/L的细菌浓度为包被浓度,1:1280为乳清稀释度。

2.2 酶标兔抗牛IgG抗体最适反应时间及底物最适反应时间 其他条件固定的情况下,酶标兔抗牛IgG抗体的反应时间分别为30, 60, 90和120 min。随着反应时间的延长,阳性和阴性的A值相应增加,当温育时间为60 min时P/N值最大。故确定酶标兔抗牛IgG抗体的最佳反应时间为60 min。其他条件固定的情况下,底物的反应

表 1 乳清的抗体效价

分娩后 (d)	时间	P/N值		
		01047	01104	9608
1	8:00		3.65	
	16:00	5.84	3.51	2.73
	24:00	5.09	2.89	
2	8:00		2.35	
	16:00	3.40	2.49	1.49
	24:00	3.86	2.23	
3	8:00	3.83	1.78	
	16:00	2.81	1.57	1.1
	24:00	3.33	1.11	
4	8:00	2.61	1.68	
	16:00	2.65	1.53	0.79
	24:00	2.16	1.81	
5	8:00	1.54	1.55	
	16:00	2.49	1.7	0.89
	24:00	2.11	1.63	
6	8:00	2.14	1.57	
	16:00	2.06	1.49	0.80
	24:00	1.57	1.48	
7	8:00	1.32	1.64	
	16:00	1.22	1.69	0.78
	24:00	1.4	1.65	

时间分别为10, 20, 30, 40 min. 随着反应时间的延长, 阴性和阳性的A值相应增加, 当温育时间为20 min时P/N值最大. 故底物最适反应时间为20 min.

2.3 免疫奶牛乳清抗体效价 按照上面得出的最佳反应条件, 检测所采集到的乳清样. 可见两头免疫奶牛抗体效价的最高值均出现在分娩后1 d, 01047初乳中IgG的含量高于01104. 随着泌乳的进行, 抗体效价迅速降低. 泌乳4 d以后, 两头奶牛的乳中抗体效价P/N值均<2.1(阴性), 而对照组奶牛仅在分娩当天检测到微弱阳性, 且P/N值均小于试验组(表1). 测得血清抗体效价见表2.

3 讨论

影响ELISA测定的因素很多, 固相载体的吸附性能直接影响ELISA的测定. 不同材料的固相载体吸附性不同, 最常用的是聚苯乙烯. 为了有效地将含游离氨基的抗体或抗原包被到聚苯乙烯载体上, 可用戊二醛对载体进行处理. 聚苯乙烯在pH相对低的情况下被激活, 而戊二醛在这种情况下不能形成聚合体, 加入pH 9.6的抗原包被液后, 便可提高戊二醛的反应性^[12]. 封闭是继包被之后用高浓度的无关蛋白质溶液再包被的过程, 让大量不相关的蛋白质填充固相载体表面尚有的未被占据的空隙, 从而排除非特异性的吸附. 为了避免酶标结合物在反应中直接吸附在固相

表 2 血清抗体效价

分娩前天数						分娩		分娩后天数		
01047	50	43	36	29	22	13	8	0	3	6
P/N值	1.04	1.10	1.90	2.80	3.41	4.27	4.26	4.56	4.54	4.34
01104	39	32	25	18			11	0	3	
P/N值	1.01	1.21	1.46	2.51			3.16	2.82	2.80	

载体上, 在稀释缓冲液中常加入高浓度的无关蛋白质, 本试验加入10 g/L BSA作为封闭液, 通过竞争以抑制结合物的吸附. 此外, 还加入了具有抑制蛋白质吸附于塑料表面的非离子型表面活性剂Tween-20, 浓度为0.5 g/L.

牛乳中高浓度的Ig主要来自血液的转移, 特别是IgG1. 在产犊前几周, IgG开始进入乳腺, 在产犊时或接近产犊时停止进入. Newby *et al*经计算, 初乳中IgG1几乎100%来自血液. Brandon *et al*^[13]及Sasaki *et al*^[14]的研究也得出相似的结论. 初乳中IgG浓度最高, 但随着泌乳进行迅速下降. Ishikawa *et al*对Holstein牛研究表明, 在产后2 h内, 初乳中总蛋白为16.8%, 到10-12 h, 降到13.5%. Leveux *et al*^[15]对60头乳样进行检测, 在头2 d内, 每次挤乳, IgG浓度下降50%左右^[14]. 本试验表明, 免疫奶牛在分娩当天初乳中抗体效价最高, 随着泌乳的进行, 抗体效价逐渐降低, 分娩4 d以后, 初乳中抗*H pylori*抗体的P/N值呈阴性. 初乳中IgG浓度除受品种、营养等因素影响外, 还受奶牛的胎次影响, 第1胎的初乳量要远远低于第2胎以后的牛. 我们也得到类似的结果. 成年牛01047初乳中的抗体效价高于青年牛01104.

我们初步建立了检测抗*H pylori*牛奶中抗体的方法, 观察了*H pylori*全菌抗原通过肌肉注射引起妊娠奶牛免疫应答、产生特异性IgG抗体的变化规律. 在由初乳向常乳的过渡中, 各种Ig的相对浓度变化很小, 但这是否就说明了不同泌乳阶段, 乳这一分泌物的生理功能只是轻微地发生了变化. 在常乳期免疫奶牛后在乳中是否有特异性抗体存在, 需要做进一步工作来证实. 而且在肠道酶环境下, 初乳中抗特异性IgG抗体是否具有免疫反应活性需要通过动物模型来深入研究. 通过食用免疫乳制品来调整肠道微生态环境, 清除肠道中病原菌和腐败菌及其产生的毒素, 从而调整整个机体的健康, 将是一种经济、理想的方法. 怎样将被动免疫采用更合理、更易接受的方法和途径运用于大规模人群防治胃肠疾病的实践是一个崭新的课题.

4 参考文献

- 1 Treiber G, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori*-2002. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2002; 91: 773-778
- 2 Hellmig S, Mascheretti S, Renz J, Frenzel H, Jelschen F, Rehbein JK, Folsch U, Hampe J, Schreiber S. Haplotype analysis of the CD11 gene cluster in patients with chronic *Helicobacter pylori* infection and gastric ulcer disease. *Tissue Antigens* 2005; 65: 271-274
- 3 Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Induction of apoptosis as a proposed pathophysiological link between glaucoma and *Helicobacter pylori* infection. *Med Hypotheses* 2004; 62: 378-381
- 4 Sykora J, Valeckova K, Hejda V, Varvarovska J, Stozicky F. Accurate noninvasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection using antigen determination in the feces in the pediatric population. *Cas Lek Cesk* 2002; 141: 425-427
- 5 周殿元, 陈烨. 幽门螺杆菌感染的药物治疗新进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 157-159
- 6 Aebischer T, Schmitt A, Walduck AK, Meyer TF. *Helicobacter pylori* vaccine development: facing the challenge. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 343-353
- 7 Gunter Bode, Isolde Piechotowski, Dietrich Rothenbacher, Hermann Brenner. *Helicobacter pylori*-Specific immune responses of children: implications for future vaccination strategy. *Clinica and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; 1126-1128
- 8 Naoko Yunoki, Kenji Yokota, Motowo Mizuno, Yoshiro Kawahara, Masayasu Adachi, Hiroyuki Okada, Shyunji Hayashi, Yoshikazu Hirai, Keiji Oguma, Takao Tsuji. antibody to heat shock protein can be used for early serological monitoring of *Helicobacter pylori* eradication treatment. *Clinica and Diagnostic Laboratory Immunology* 2000; 574-577
- 9 张世联, 刘冉, 王薇. 牛幽门螺杆菌抗体中和菌体蛋白对Hela细胞的生长抑制作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1828-1833
- 10 Ewaschuk JB, Naylor JM, Chirino-Trejo M, Zello GA. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. *Can J Vet Res* 2004; 68: 249-253
- 11 刘文忠, 施尧, 戈之铮. 幽门螺杆菌研究进展. 上海: 科学技术文献出版社, 2001: 91-93
- 12 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 郭爱珍. 酶免疫测定技术. 南京: 南京大学出版社, 1998: 137-139
- 13 Brandon MR, Watson DL, Lascelles AK. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1971; 49: 613-623
- 14 Sasaki M, Davis CL, Larson BL. Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition. *J Dairy Sci* 1976; 59: 2046-2055
- 15 Levieux D, Ollier A. Bovine immunoglobulin G, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. *J Dairy Res* 1999; 66: 421-430

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第二届全国小肠疾病学术会议

本刊讯 第二届全国小肠疾病学术会议将于2006-08-23/27在太原举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文, 结构式摘要(1000字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-04-31截稿.

2 联系方式

山西省太原市双塔东街29号山西少人民医院内镜中心 陈星; 邮编: 030012; 电话: 0351-4960028; E-mail: senj29@163.com.

扑热息痛引起肝细胞损害的机制

田丰, 李岩, 王颖, 吴作艳, 王学清

田丰, 李岩, 王颖, 吴作艳, 王学清, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)消化科 辽宁省沈阳市 110004
通讯作者: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)消化科. liyan99@medmail.com.cn
电话: 024-83956416
收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-03-07

Mechanism of acetaminophen-induced hepatocellular injury

Feng Tian, Yan Li, Ying Wang, Zuo-Yan Wu, Xue-Qing Wang

Feng Tian, Yan Li, Ying Wang, Zuo-Yan Wu, Xue-Qing Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chinese Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Yan Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Chinese Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. liyan99@medmail.com.cn
Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-03-07

Abstract

AIM: To investigate the role of hepatocellular apoptosis in hepatitis induced by acetaminophen (AAP).

METHODS: The Sprague Dawley (SD) rat model of acetaminophen-induced hepatitis was established using AAP. After administration, the rats were killed at the end of 3, 6, 12, and 24 h, respectively. In both AAP and control group, we detected levels of serum alanine transaminase (ALT), observed pathological changes of hematoxylin and eosin (HE) stained liver with light microscope, and detected hepatocellular apoptosis using TUNEL method and electron microscopy.

RESULTS: The level of serum ALT (nkat/L) in AAP group was significantly higher than that in control group (3, 6, 12, 24 h: 1167 ± 151 vs 587 ± 89 , 2154 ± 255 vs 573 ± 76 , 4221 ± 929 vs 751 ± 82 , $13\ 203 \pm 1393$ vs 780 ± 161 , all $P < 0.01$), which increased progressively and reached the peak at 24 h. In AAP group, different degrees of necrosis was detected and aggravated progressively, and it also reached the peak at 24 h. There were

a large number of apoptotic hepatocytes around central veins and they reached the peak at 12 h in AAP group. However, few apoptotic hepatocytes were observed in control group. The apoptotic index (AI) in AAP group was markedly higher than that in control group (3, 6, 12, 24 h: $13.1\% \pm 2.9\%$ vs $1.8\% \pm 0.5\%$, $24.8\% \pm 5.3\%$ vs $1.7\% \pm 0.5\%$, $40.4\% \pm 3.7\%$ vs $2.0\% \pm 0.4\%$, $35.3\% \pm 3.5\%$ vs $1.92\% \pm 0.3\%$, $P < 0.01$). Electron microscopy indicated that hepatocytes of AAP group demonstrated unequivocal appearance of apoptotic traits, especially at 12 h.

CONCLUSION: Both apoptosis and necrosis exist in AAP-induced hepatocytic injury. Apoptosis was dominant in the early stage (within 12 h) while necrosis was dominant in the late stage (at 24 h).

Key Words: Acetaminophen; Hepatocellular injury; Necrosis; Apoptosis

Tian F, Li Y, Wang Y, Wu ZY, Wang XQ. Mechanism of acetaminophen-induced hepatocellular injury. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(11):1107-1110

摘要

目的: 探讨肝细胞凋亡在扑热息痛(acetaminophen, AAP)肝损害中作用。

方法: 建立SD大鼠AAP肝损害模型; 分别于给药后3, 6, 12, 24 h处死大鼠, AAP组和对照组测定血清ALT水平, HE染色光镜下观察肝脏病理改变, 原位末端标记(TUNEL)法和透射电镜检测肝细胞凋亡。

结果: AAP组各时间点血清ALT(nkat/L)水平均显著高于对照组(3, 6, 12, 24 h: 1167 ± 151 vs 587 ± 89 , 2154 ± 255 vs 573 ± 76 , 4221 ± 929 vs 751 ± 82 , $13\ 203 \pm 1393$ vs 780 ± 161 , $P < 0.01$), 随时间进行性升高, 24 h达高峰; AAP组可见不同程度肝细胞坏死, 随时间进行性加重, 24 h达高峰, 对照组未见肝细胞坏死; AAP组中央静脉周围可见大量凋亡细胞, 12 h达高峰, 对照组罕见凋亡细胞, AAP组各时间点肝细胞凋亡指数(AI)均显著高于对照组

■背景资料

扑热息痛(AAP)过量使用可以造成严重的肝损害。多数学者认为AAP引起肝细胞死亡主要是通过坏死的方式, 是否存在细胞凋亡存在争议。

■创新盘点

本文建立SD大鼠AAP肝损害模型,用TUNEL法和透射电镜检测肝细胞凋亡,证实AAP肝损害过程中同时存在大量的肝细胞坏死和凋亡,早期以凋亡为主,后期以坏死为主。

(3, 6, 12, 24 h: $13.1\% \pm 2.9\%$ vs $1.8\% \pm 0.5\%$, $24.8\% \pm 5.3\%$ vs $1.7\% \pm 0.5\%$, $40.4\% \pm 3.7\%$ vs $2.0\% \pm 0.4\%$, $35.3\% \pm 3.5\%$ vs $1.92\% \pm 0.3\%$, $P < 0.01$);透射电镜下观察, AAP组可见明显的肝细胞凋亡现象, 12 h最易见到, 对照组肝组织超微结构基本正常。

结论: AAP肝损害过程中同时存在肝细胞坏死和凋亡, 早期(给药后12 h内)以凋亡为主, 后期(给药后24 h)以坏死为主。

关键词: 扑热息痛; 肝损害; 坏死; 细胞凋亡

田丰, 李岩, 王颖, 吴作艳, 王学清. 扑热息痛引起肝细胞损害的机制. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1107-1110
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1107.asp>

0 引言

扑热息痛(acetaminophen, AAP)是临床上应用最广泛的解热镇痛药物, 在正常治疗剂量下应用是比较安全的, 但过量使用可以造成人和动物严重的肝损害。多数学者认为AAP引起肝细胞死亡主要是通过坏死的方式, 而对于在此过程中是否存在细胞凋亡及其地位和作用存在争议^[1-2]。我们建立Sprague Dawley (SD)大鼠AAP肝损害模型, 用原位末端标记(TUNEL)法和透射电镜检测肝细胞凋亡, 探讨细胞凋亡在AAP肝损害中的地位和作用。

1 材料和方法

1.1 材料 5-6周龄SD大鼠, 体质量180-240 g, 购自中国医科大学动物实验中心; AAP购自Sigma公司; 原位细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 自动生物化学分析仪(日本岛津公司); 普通光学显微镜(日本Olympus公司); JEM-1200EX透射电镜(日本Olympus公司)。

1.2 方法 SD大鼠随机分为对照组和AAP组, 每组20只。AAP组给予AAP (1 g/kg) ip^[3], 对照组给予等量PBS液ip。于给药后3, 6, 12, 24 h(每时点各组分别有5只大鼠)用水合氯醛ip麻醉, 心脏穿刺取血, 分离血清, -20℃保存; 于肝脏中叶取2块肝组织, 分别置于40 g/L甲醛、25 g/L戊二醛中固定。血清ALT测定用自动生物化学分析仪进行。取肝组织, 用40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 5 μm厚切片, 常规HE染色, 光镜下观察其病理改变, 计算坏死细胞面积百分比(坏死细胞面积/所有细胞面积×100%)^[1]。原位细胞凋亡检测采用TUNEL法。肝组织切片制作方法同上, 步骤

表 1 SD大鼠AAP肝损害AI (%), mean ± SD

分组	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	1.81 ± 0.54	1.74 ± 0.54	2.00 ± 0.43	1.92 ± 0.35
AAP组	13.09 ± 2.86 ^b	24.80 ± 5.28 ^b	40.42 ± 3.71 ^b	35.30 ± 3.49 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

严格按试剂盒说明书进行。每例标本切片随机选取5个400倍视野, 计算出平均每100个细胞中的凋亡细胞数, 并以百分数表示作为凋亡指数(AI)。取1 mm³肝组织, 25 g/L戊二醛固定, 超薄切片700 Å, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, JEM-1200EX透射电镜观察超微结构的形态变化。

统计学处理 SPSS 11.0统计软件进行分析, 数据用均数±标准差(mean±SD)表示, 两组均数比较用 t 检验。

2 结果

2.1 血清ALT水平变化 AAP组各时间点血清ALT(nkat/L)水平均显著高于对照组(给药后3, 6, 12, 24 h分别为: 1167 ± 151 vs 587 ± 89 , 2154 ± 255 vs 573 ± 76 , 4221 ± 929 vs 751 ± 82 , $13\ 203 \pm 1393$ vs 780 ± 161 , $P < 0.01$), 随时间进行性升高, 24 h达高峰。

2.2 肝组织病理学变化 AAP组肝脏明显肿大、充血, 镜下: 轻者表现为肝细胞点状坏死, 重者表现为小叶中心肝细胞广泛的炎性细胞浸润、出血、带状坏死, 随时间进行性加重, 24 h达高峰(各时间点坏死细胞面积百分比分别为: $19.9\% \pm 7.0\%$, $30.2\% \pm 6.1\%$, $46.6\% \pm 8.4\%$, $65.2\% \pm 8.1\%$), 对照组未见肝细胞坏死。

2.3 原位细胞凋亡检测 对照组罕见凋亡细胞, AAP组中央静脉周围可见大量凋亡细胞, 12 h达高峰; AAP组各时间点AI均显著高于对照组($P < 0.01$, 表1, 图1)。

2.4 肝组织超微结构观察 对照组肝组织超微结构基本正常; AAP组可见明显的肝细胞凋亡现象, 如胞质和核浓缩、染色质边聚、凋亡小体形成等, 12 h最易见到(图2)。

3 讨论

细胞的死亡方式有: 坏死和程序性细胞死亡(细胞凋亡)两种。AAP肝损害中肝细胞死亡方式存在争议, 一般认为是通过坏死的方式, 但一些报道显示细胞凋亡可能在这一过程中起着重要的作用^[4-5]。Ray *et al*^[4]通过生化、病理、超微结构

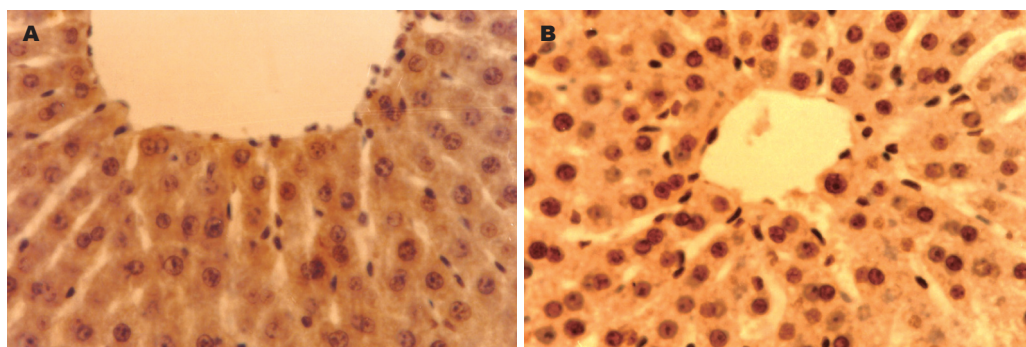


图 1 12 h肝组织细胞凋亡 (TUNEL $\times 400$). A: 对照组; B: AAP组.

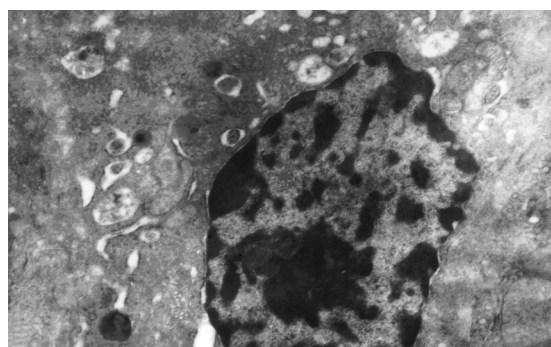


图 2 SD大鼠AAP肝损害12 h肝组织超微结构 (TEM $\times 8000$).

的标准证实, 过量的AAP既可以引起肝细胞坏死也可以引起肝细胞凋亡, AAP肝损害中的细胞死亡40%以上是通过凋亡, 而非坏死, 而另外一些学者持相反意见. Gujral *et al*^[1]证实, AAP肝损害可引起肝细胞凋亡的明显增加, 但90%以上的肝细胞死亡仍然是通过坏死, 而非凋亡; 在细胞凋亡发生、发展过程中, Caspases激活的级联反应起着关键作用, Caspase-3是级联反应下游一个重要的效应器, 体内实验发现^[6-8], 在TNF- α 和Fas受体介导的肝细胞凋亡中, 很容易发现Caspase-3被激活、活性增强, 阻断其激活可有效的防止受体介导的肝细胞凋亡发生; 而在AAP肝损害中, 未发现Caspase-3被激活、活性增强^[1], 阻断其激活也不能阻止肝损害的发生^[9]; 实际上, AAP通过损害肝细胞线粒体功能而阻断了通过线粒体的凋亡信号转导, 从而阻止了TNF- α 和Fas受体介导的肝细胞凋亡^[9]; Adams *et al*^[10]报道, 过量表达的抗凋亡蛋白Bcl-2实际上加重了AAP肝损害.

研究显示, 在AAP引起的肝损害中, 许多细胞同时具备坏死和凋亡的特征, 被称为“迷茫的肝细胞(puzzled hepatocytes)”^[11]; 此外, 坏死和凋亡并非两个完全独立的过程, 在存在大量凋亡的情况下, 可能转而发生“继发性坏死

(secondary necrosis)”, 这与通常意义上的坏死是无法区分的^[12-13]. 以上可能是引起AAP肝损害中关于肝细胞死亡方式争议的原因之一. 检测凋亡细胞的方法很多, 但形态改变仍是确定细胞凋亡的最可靠方法. 凋亡细胞的典型形态改变如胞质的固缩, 染色质浓缩成半月形或帽状附于核膜, 核的碎裂和凋亡小体形成等, 在透射电镜下得到最佳体现, 因而通过透射电镜进行细胞超微结构观察是凋亡细胞判定最可靠的依据. TUNEL法是应用最为广泛的检测凋亡细胞方法, 其优点是可用于原位标记, 可用于病理组织, 并可进行定量分析. 我们应用SD大鼠建立AAP肝损害模型, 联合应用上述两种方法进行凋亡细胞检测, 证实AAP肝损害过程中同时存在大量的肝细胞坏死和凋亡, 早期以凋亡为主(12 h), 后期以坏死为主(24 h), 且与ALT水平相平行, 说明在AAP肝损害过程中两者是共存的. 同时我们发现24 h细胞凋亡较12 h有所减少, 而坏死却显著增多, 因而推测给药12 h后在大量细胞凋亡的基础上存在“继发性坏死”的可能.

临床上治疗AAP肝损害的方法只有早期应用N-乙酰半胱氨酸和肝移植, 缺乏其他经济、有效的治疗方法. 今后, 我们打算通过对Caspase-3, Bcl-2, Bcl-L, Bcl-X等与凋亡密切相关蛋白表达的检测, 进一步探讨AAP引起细胞凋亡的机制, 进而为临床提供一条通过抑制细胞凋亡来治疗AAP肝损害的可行方法.

4 参考文献

- Gujral JS, Knight TR, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice: apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol Sci* 2002; 67: 322-328
- Ray SD, Jena N. A hepatotoxic dose of acetaminophen modulates expression of BCL-2, BCL-X(L), and BCL-X(S) during apoptotic and necrotic death of mouse liver cells *in vivo*. *Arch Toxicol* 2000; 73:

■同行评价

本文探讨了肝细胞凋亡在扑热息痛(AAP)肝损害中作用, 有一定的理论和临床价值, 提供了一定的有意义的信息. 研究具有一定的新颖性, 符合伦理学要求.

- 594-606
- 3 Bauer I, Vollmar B, Jaeschke H, Rensing H, Kraemer T, Larsen R, Bauer M. Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat. *J Hepatol* 2000; 33: 395-406
 - 4 Ray SD, Mumaw VR, Raje RR, Fariss MW. Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279: 1470-1483
 - 5 Ferret PJ, Hammoud R, Tulliez M, Tran A, Trebeden H, Jaffray P, Malassagne B, Calmus Y, Weill B, Batteux F. Detoxification of reactive oxygen species by a nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *Hepatology* 2001; 33: 1173-1180
 - 6 Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A, Jones DA. Activation of Caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J Immunol* 1998; 160: 3480-3486
 - 7 Bajt ML, Lawson JA, Vonderfecht SL, Gujral JS, Jaeschke H. Protection against Fas receptor-mediated apoptosis in hepatocytes and nonparenchymal cells by a Caspase-8 inhibitor *in vivo*: evidence for a postmitochondrial processing of Caspase-8. *Toxicol Sci* 2000; 58: 109-117
 - 8 Bajt ML, Vonderfecht SL, Jaeschke H. Differential protection with inhibitors of Caspase-8 and Caspase-3 in murine models of tumor necrosis factor and Fas receptor-mediated hepatocellular apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 175: 243-252
 - 9 Lawson JA, Fisher MA, Simmons CA, Farhood A, Jaeschke H. Inhibition of Fas receptor (CD95)-induced hepatic Caspase activation and apoptosis by acetaminophen in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 156: 179-186
 - 10 Adams ML, Pierce RH, Vail ME, White CC, Tonge RP, Kavanagh TJ, Fausto N, Nelson SD, Bruschi SA. Enhanced acetaminophen hepatotoxicity in transgenic mice overexpressing BCL-2. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 907-915
 - 11 Ray SD, Raje RR. Perplexed mouse hepatocytes *in vivo* show signs of both apoptosis and necrosis under the influence of acetaminophen and dimethylnitrosamine. Gordon Research Conference on: "Clinical and Experimental Cancer Chemotherapy", New Hampshire, 1994
 - 12 Lemasters JJ. V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol* 1999; 276: G1-G6
 - 13 Levin S, Bucci TJ, Cohen SM, Fix AS, Hardisty JF, LeGrand EK, Maronpot RR, Trump BF. The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 484-490

电编 张敏 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十五次全国中西医结合肝病学术会议

本刊讯 第十五次全国中西医结合肝病学术会议将于2006-09在天津举行, 现将征文通知公布如下:

1 截稿日期

2006-06-15截稿

2 联系方式

上海中医药大学 胡义扬; 邮编: 201203

应用SELDI-TOF-MS技术分析SEB染毒小鼠血清蛋白质组学变化

张靖, 张军, 应天翼, 高川, 宋云扬, 王惠芳

张靖, 张军, 应天翼, 高川, 宋云扬, 王惠芳, 防化研究院第四研究所 北京市 102205

通讯作者: 王惠芳, 102205, 北京市, 防化研究院第四研究所. bjzhangjing@tom.com

电话: 01066758323

收稿日期: 2006-03-10 接受日期: 2006-03-24

Application of SELDI-TOF-MS technology in detection of serum proteomic changes of mice exposed to staphylococcal enterotoxin B

Jing Zhang, Jun Zhang, Tian-Yi Ying, Chuan Gao, Yun-Yang Song, Hui-Fang Wang

Jing Zhang, Hui-Fang Wang, Jun Zhang, Tian-Yi Ying, Chuan Gao, Yun-Yang Song, Research Institute of Chemical Defense, Beijing 102205, China

Correspondence to: Hui-Fang Wang, Research Institute of Chemical Defense, Beijing 102205, China. bjzhangjing@tom.com

Received: 2006-03-10 Accepted: 2006-03-24

Abstract

AIM: To study the changes of serum proteome in mice exposed to staphylococcal enterotoxin B (SEB).

METHODS: The serum proteins in mice exposed to SEB were detected by surfaced enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy (SELDI-TOF-MS) and weak cation exchange proteinchip. The data were read with PBSII-C type proteinchip reader and analyzed with Biomarker Wizard and Biomarker Patterns Software of Ciphergen Company.

RESULTS: In comparison with the control group, there were significant deviations of 11 proteins in the test group. Among them, 8 proteins were up-regulated and 3 down-regulated.

CONCLUSION: Marked serum proteomic changes exist in mice exposed to SEB, which may be related to the toxicity and pathological effect of SEB.

Key Words: SELDI-TOF-MS; Protein biochip; Staphylococcal enterotoxin B; Marker protein

Zhang J, Zhang J, Ying TY, Gao C, Song YY, Wang HF. Application of SELDI-TOF-MS technology in detection of serum proteomic changes of mice exposed to staphylococcal enterotoxin B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14(11): 1111-1114

摘要

目的: 把蛋白质芯片和SELDI质谱技术应用于金黄色葡萄球菌肠毒素B(staphylococcal enterotoxin B, SEB)染毒小鼠血清蛋白质组研究, 分析染毒小鼠血清蛋白质组的变化。

方法: 采用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱技术和弱阳离子交换蛋白质芯片检测染毒小鼠血清蛋白质的变化, 使用PBSII-C型蛋白质芯片阅读器读取数据, 获得的结果采用Ciphergen公司的Biomarker wizard和Biomarker Patterns System软件进行分析。

结果: 实验组与对照组血清蛋白质谱相比有11个蛋白质有显著差异, 其中8个蛋白质表达上调, 3个表达下调。

结论: SEB染毒小鼠血清蛋白质组发生显著变化, 可能与SEB的毒理学与病理学作用有密切关系。

关键词: SELDI-TOF-MS; 蛋白质芯片; SEB; 标志蛋白

张靖, 张军, 应天翼, 高川, 宋云扬, 王惠芳. 应用SELDI-TOF-MS技术分析SEB染毒小鼠血清蛋白质组学变化. *世界华人消化杂志* 2006;14(11):1111-1114

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1111.asp>

0 引言

金黄色葡萄球菌肠毒素B(SEB)是一种腹泻型毒素, 可引起食物中毒且发病较急, 其中毒的第一个症状为恶心, 接着呕吐、腹部痉挛和腹泻

■背景资料

表面增强激光解吸电离(SELDI)蛋白质芯片技术是2002年提出出来的一项新兴的蛋白质组学研究技术, 已经引起了学术界的高度重视, 在生物学和临床医学等方面具有广泛的应用前景。利用蛋白质芯片具有高度并行性、高通量、微型化和自动化等其他方法无法比拟的优越性, 在病理学、药理学和毒理学等方面初步取得了卓越的研究成果。金黄色葡萄球菌肠毒素B是肠源性毒素, 到目前为止, 人们尚不清楚其作用机制。

■创新亮点

本文应用SELDI-TOF-MS技术分析SEB中毒所引起的蛋白质组学的变化,为临床治疗提供依据,同时探索SELDI技术在细菌类毒素中毒诊断方面的应用,以便深入分析毒素中毒病理学和毒理学变化。

等,也可引起肺水肿、循环衰竭;重者吐血、便血、甚至虚脱、休克,呼吸困难及发绀,脓毒血症甚至死亡^[1-4]。金黄色葡萄球菌对青霉素、磺胺等耐受,中毒后救治非常棘手。迄今为止人们对SEB的中毒机制仍不十分清楚,任何疾病在出现病理变化之前,其细胞内部的蛋白质成分和数量都会发生相应的变化。因而,可以通过动态观察病变早期蛋白质组的改变推断疾病的作用机制。目前蛋白质组学研究的主要技术是双向电泳和生物质谱技术,虽然双向电泳技术已经比较成熟,但他的实验过程复杂、样本的需求量大、低通量、重复性差且实验成本很高。为适应蛋白质组学研究的发展,一些新技术应运而生,其中表面增强激光解析电离(SELDI)蛋白质芯片技术^[5-6]。由诺贝尔化学奖获得者田中发明、Ciphergen系统生物公司制造的特殊蛋白质芯片质谱技术—表面增强的激光解析电离飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)已开始引起学术界的重视,并在临床检测中做出卓越成果。蛋白质芯片具有高度并行性、高通量、微型化和自动化等其他方法难以比拟的优越性,蛋白质芯片采用光敏染料标记,灵敏度高,准确性好^[7-8]。同时SELDI蛋白质芯片技术的出现部分弥补了双向电泳技术的不足,使筛选低丰度小分子蛋白甚至肽成为现实。目前SELDI技术主要应用于生物医学基础研究和疾病的诊断,特别是在肿瘤的早期诊断方面用得较多,目前极少见到有关SELDI技术在病理学研究方面的报道^[9-11]。我们尝试SELDI技术应用于肠毒素SEB的蛋白质组病理学研究。实验中,采用蛋白质芯片技术检测SEB染毒小鼠血清蛋白质谱的变化,了解SEB中毒后血清蛋白质组学中敏感性高和特异性强的蛋白分子,探索SELDI技术在肠源性细菌检测、疾病诊断、预防、治疗及病理学研究中的应用。

1 材料和方法

1.1 材料 乙腈、三氟乙酸、尿素、Hepes、水(HPLC级)、Tris碱、CHAPS、DTT、SPA(Sinapinic acid)购自Sigma公司,其他为市售进口试剂。BALB/c小鼠,8周龄♀,购自芭尔比公司。WCX2芯片(弱阳离子交换芯片)和蛋白芯片飞行时间质谱仪PBSII-C,购于美国Ciphergen Biosystems公司。

1.2 方法 SEB的染毒剂量为2 mg/kg, ip, 对照组

注射相同体积的生理盐水。小鼠染毒4 h后眼眶采血^[12], 4℃静置2 h, 3000 g离心5 min, 分装血清, 每管20 μL, 冻存于-70℃备用。从-70℃冰箱内取出血清, 冰上解冻, 4℃ 1000 g离心4 min。取血清10 μL加入U9处理液20 μL(9 mol/L尿素, 20 g/L CHAPS, 10 g/L DTT, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0), 充分混匀, 冰浴振荡30 min后加入100 mmol/L NaAc 360 μL, pH 4.0, 立即混匀, 静置30 min后上样。将WCX2芯片安装于bioprocessor上, 每孔加入结合缓冲液200 μL, 室温振荡洗涤2次, 每次5 min, 用力甩干。每孔分别加入样本混合液100 μL, 振荡孵育1 h, 甩去样品, 用100 mmol/L NaAc 200 μL, pH 4.0室温振荡洗涤2次, 每次5 min, 甩干, 再用超纯水洗涤1次, 立即甩干。拆开bioprocessor, 取出芯片, 待芯片表面自然晾干后, 各点加2次SPA0.5 μL, 芯片表面干燥后, 采集数据。采用蛋白芯片飞行时间质谱仪对结合在弱阳离子WCX2芯片上的血清蛋白进行读取分析, 设定最高 M_r 为50 000, 优化范围为2000-20 000, 激光强度195, 检测灵敏度为8。考虑到基质峰的存在, 将1000以下的峰滤去, 以免基质峰对结果造成干扰。采用Ciphergen Biosystems公司的Proteinchip 3.1版本的分析软件自动采集数据, 采用Biomarker Wizard软件分析实验前后血清的蛋白质指纹图谱差异。图谱标准化的参数设定: 强度范围-5-75, 质荷比范围1000-50 000, 并以6825 Da蛋白峰进行校正对齐。

统计学处理 采用Ciphergen Biosystems公司的Proteinchip 3.1软件对数据进行统计学处理, 比较两组之间蛋白质峰强度时, $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 差异蛋白质峰的检测 所有原始数据先用Proteinchip软件做校正(总离子强度及分子质量的均一化)。对位于1000-50 000的质荷比峰值, 用Biomarker Wizard过滤噪音, 初始噪音过滤值为5, 第2次的噪音过滤值为2, 以10%为最小阈值进行聚类。得到初步结果后, 对筛选出来的179个质/荷比峰(为单电荷峰), 做实验组与对照组的成组数据均数比较 t 检验, 发现实验组和对照血清蛋白质图谱相比有11个明显差异蛋白峰, 其中8个蛋白质上调, 3个下调(表1)。

2.2 差异蛋白质峰图和模拟胶图的比较 11个差

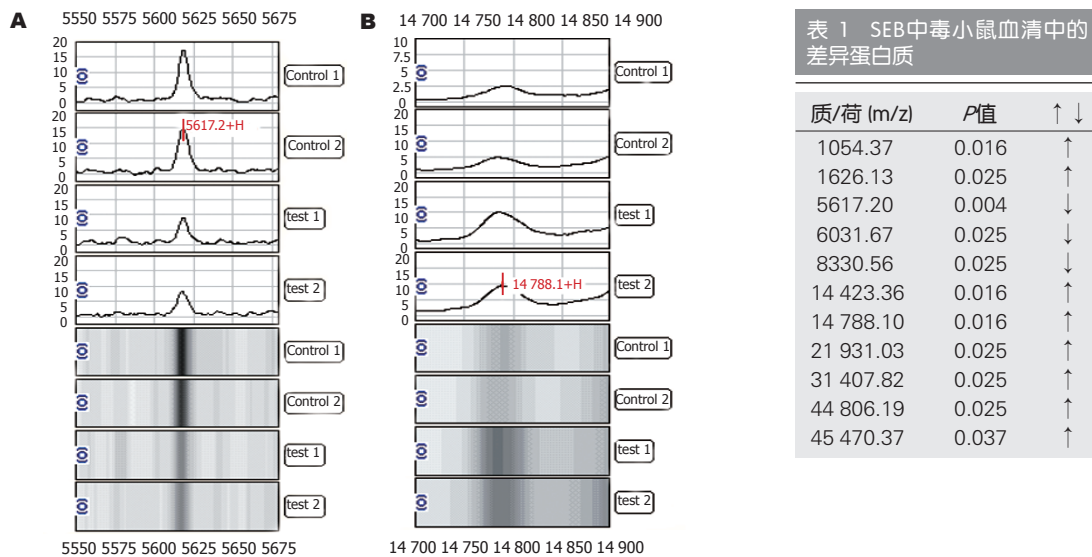


图 1 蛋白质峰差异图.

表 2 SWISS-PROT蛋白质数据库分析

理论 M_r	在SWISS-PROT小鼠蛋白质数据库中的检索结果
1054.37	Angiotensinogen
5617.20	TGF- α
6031.67	Granulins(PC cell-derived growth factor)
8330.56	Cytochrome C oxidase polypeptide Vic, Small inducible cytokine B5
14 423.36	Cystatin F, Leptin receptor overlapping transcript-like1, Profilin, Ribonuclease K6
14 788.49	Bone morphogenetic protein 6(BMP-6)(VGR-1), Fatty acid-binding protein, Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1B
21 931.01	α -1-acid glycoprotein 1, SERTA domain-containing protein3, Tumor necrosis factor ligand superfamily member 7, Uracil phosphoribosyltransferase
31 407.82	Killer cell lectin-like receptor 8, Ras suppressor protein 1, Erythrocyte band 7 integral membrane protein
44 806.19	Aspartate a minotransferase, 47kDa heat shock protein, LAG1 longevity assurance homolog 6, Phosphorylase b kinase gamma catalytic chain, 3-ketoacyl-CoA thiolase 2
45 470.37	Synaptotag min7, Transcription factor 7(T-cell-specific transcription factor1), TNF receptor-associated factor 1

异蛋白质的峰图和模拟胶图都有明显的差异, 以质/荷比为5617.20和从14 788.10的2个蛋白质为例, 比较其峰图和胶图的差异(图1). 采用CIPHERGEN公司Biomarker Pattern System软件对来源于Biomarker Wizard的数据进行处理, 结果显示, 实验组与对照组血清相比有11个标志蛋白有显著的差异. 为确定这11种差异蛋白的类别, 在ExPASy的SWISS-PROT蛋白质数据库中利用TagIdent tool根据分子量在小鼠蛋白质数据库中模糊检索血清蛋白. 检索时以测定的质/荷比为理论分子质量, 同时按照所用质谱仪的检测误差 $\pm 0.1\%$ 设定分子质量的误差, 检索与分析的结果见表2.

3 讨论

每年都会有SEB引起的食物中毒事件暴发, 欧洲某些国家由金葡菌肠毒素引起的食物中毒占细菌性中毒的50%以上, 加拿大为45%, 美国为33%. 在我国的细菌性食物中毒病例中有20%-25%系由金黄色葡萄球菌肠毒素所引起. 另外, 肠毒素也是引起医院和公共场所出现获得性感染的主要原因. 其致病的主要原因在于引发脓毒症和创伤感染. SEB产生菌在烧伤、创伤感染中占80%以上的比例, 且对青霉素、磺胺等耐受, 常引发死亡, 是创伤外科和烧伤科非常棘手的问题^[13-14]. 此外, SEB还可能随细菌入侵皮肤和黏膜的微小裂口, 进入血液, 引起心

内膜炎、脓肿广泛转移等疾病。在SEB中毒的检测方面主要采取的是病原菌的分离和ELISA检测等。SELDI-TOF-MS技术是一项全新的蛋白质组学研究方法,同时具有快速、简单、样本用量极少、灵敏、高通量等优点,可检测到 $\text{fmol}(10^{-15} \text{ mol})$ 数量级的微量蛋白质,且一次获得成千上万的蛋白质数据,在临床检验中具有广泛的应用前景。血清是机体在宏观水平上对组织细胞调控的重要介质,SEB中毒后血清成分发生的变化是SEB对多种组织器官损伤的结果。采用SELDI技术分析实验组与对照组BALB/c小鼠血清蛋白质组的变化,主要是从蛋白质组水平研究SEB中毒的分子机制。通过对SEB染毒小鼠血清进行SELDI检测分析,确定的标志蛋白可用于食物中毒诊治和SEB中毒临床诊断。

目前,国内外对于血清相关的生物活性的研究主要是采取传统的生化方法,SELDI-TOF-MS技术的应用必将促进疾病诊断检测方法的发展^[15-16]。SELDI-TOF-MS可确定疾病的标志蛋白,同时检测的结果可在SWISS-PROT蛋白质数据库查询确定可能的标志蛋白分子,但该技术也存在着一些不足之处,例如不能精确地推断蛋白,不过检测出的蛋白中 M_r 为1054.37, 5617.20和6031.67的蛋白检索到的结果是唯一的蛋白,且与SEB的作用密切相关。其中 M_r 为5617.20的蛋白可能是TGF- α ,他是肿瘤患者高表达的蛋白,而在本实验中SEB染毒的小鼠则表现为该蛋白表达水平下调,从而证实SEB对肿瘤治疗有一定的效果,且SEB降低TGF- α 的表达水平是其中原因之一。对其他差异蛋白的判定考虑到蛋白质数据库提供的只是根据氨基酸序列计算的理论 M_r ,而大多数真核生物蛋白质存在一定的修饰,故所得结果仍需根据SEB的生物活性相关的因素推断,或进一步通过肽指纹图谱鉴定来研究。尽管如此,研究结果还是清楚地表明,SELDI技术在消化系统的基础研究和临床研究中有着广泛的应用前景。

4 参考文献

- 1 Madsen JM. Toxins as weapons of mass destruction.

- A comparison and contrast with biological-warfare and chemical-warfare agents. *Clin Lab Med* 2001; 21: 593-605
- 2 Yuan L, Lowell GH, Hoover DL, Colleton CA, Hammack CA Sr, Young LD, Fischer R, Patchen ML, Cross AS. Kinetics of cellular and cytokine responses in a chimeric mouse model for the study of staphylococcal enterotoxin B pathogenesis. *Immunol Lett* 2000; 71: 19-26
- 3 Lavoie PM, Thibodeau J, Erard F, Sekaly RP. Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research. *Immunol Rev* 1999; 168: 257-269
- 4 姚咏明, 盛志勇. 金黄色葡萄球菌肠毒素与多器官功能障碍综合症. *中国危重病急救医学* 2001; 13: 517-519
- 5 Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000; 21: 1164-1177
- 6 Petricoin EF, Liotta LA. SELDI-TOF-based serum proteomic pattern diagnostics for early detection of cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15: 24-30
- 7 费嘉, 马文丽, 郑文岭. 蛋白质芯片在蛋白质组学研究中的作用. *生命科学* 2005; 17: 132-136
- 8 Aldred S, Grant MM, Griffiths HR. The use of proteomics for the assessment of clinical samples in research. *Clin Biochem* 2004; 37: 943-952
- 9 Henderson NA, Steele RJ. SELDI-TOF proteomic analysis and cancer detection. *Surgeon* 2005; 3: 383-390
- 10 Bons JA, Wodzig WK, van Dieijen-Visser MP. Protein profiling as a diagnostic tool in clinical chemistry: a review. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1281-1290
- 11 Clarke CH, Buckley JA, Fung ET. SELDI-TOF-MS proteomics of breast cancer. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1314-1320
- 12 Pacheco-Lopez G, Niemi MB, Kou W, Harting M, Del Rey A, Besedovsky HO, Schedlowski M. Behavioural endocrine immune-conditioned response is induced by taste and superantigen pairing. *Neuroscience* 2004; 129: 555-562
- 13 Do Carmo LS, Cummings C, Linardi VR, Dias RS, De Souza JM, De Sena MJ, Dos Santos DA, Shupp JW, Pereira RK, Jett M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathog Dis* 2004; 1: 241-246
- 14 van Gessel YA, Mani S, Bi S, Hammamieh R, Shupp JW, Das R, Coleman GD, Jett M. Functional piglet model for the clinical syndrome and postmortem findings induced by staphylococcal enterotoxin B. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229: 1061-1071
- 15 Vitzthum F, Behrens F, Anderson NL, Shaw JH. Proteomics: from basic research to diagnostic application. A review of requirements & needs. *J Proteome Res* 2005; 4: 1086-1097
- 16 Hu J, Coombes KR, Morris JS, Baggerly KA. The importance of experimental design in proteomic mass spectrometry experiments: some cautionary tales. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2005; 3: 322-331

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

野艾组分对幽门螺杆菌的体外抑菌作用

戴小军, 刘延庆, 陈红菊, 陈群, 严华

戴小军, 扬州大学医学院中医系 江苏省扬州市, 225001
刘延庆, 徐州工程学院 江苏省徐州市 221008
陈红菊, 严华, 扬州大学医学院微生物学教研室 江苏省扬州市 225001
陈群, 扬州大学医学院形态学教研室 江苏省扬州市 225001
国家中医药管理局资助课题, NO. 04-05ZP35
通讯作者: 刘延庆, 221008, 江苏省徐州市, 徐州工程学院.
lyq@xzit.edu.cn
电话: 0516-83105169 传真: 0516-83202744
收稿日期: 2006-02-15 接受日期: 2006-03-20

摘要

目的: 分析中药野艾可能的抑制幽门螺杆菌(*H. pylori*)组分。

方法: 采用琼脂稀释法测定野艾的各种提取物的最小抑菌浓度。

结果: 四种野艾提取物最低抑菌浓度分别为: 正己烷提取物为10.24 g/L、乙酸乙酯提取物为2.56 g/L、正丁醇提取物为5.12 g/L, 野艾乙醇提取物的MIC>10.24 g/L。

结论: 野艾的乙酸乙酯提取物具有较强的抑制*H. pylori*生长的作用。为进一步开发野艾的药用价值提供了资料。

关键词: 野艾; 幽门螺杆菌; 药敏; 最低抑菌浓度

戴小军, 刘延庆, 陈红菊, 陈群, 严华. 野艾组分对幽门螺杆菌的体外抑菌作用. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1115-1118
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1115.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)是一种能特异定植于人胃黏膜上皮细胞表面的微需氧革兰阴性菌。现已明确*H. pylori*感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤和胃癌密切相关^[1-7], 严重威胁着人类的健康。根除*H. pylori*已成为现代治疗一些常见*H. pylori*相关性的胃肠疾病的重要措施^[8-12], 虽然有多种药物联合疗法, 但因存在副作用及耐药性, 且价格昂贵, 应用受到一定的限制。为此寻求高效、低毒、价廉的药物治是是当前抗*H. pylori*研究的重大课题。中药在我国人民几千

年来与疾病斗争中发挥着不可替代的作用, 近十余年来国内外进行了大量中药抗*H. pylori*的研究, 取得了可喜的成果, 但中药研究的制剂大多为水煎剂^[13-17], 对中药抗*H. pylori*活性部位的筛选和相关实验研究报道还很罕见。野艾为菊科蒿属多年生草本植物*A. lavandulaefolia* DC的干燥叶, 分布于江苏、山东、东北、华北及安徽、浙江和江西等地, 常作“艾叶”入药, 有较好的抗菌作用, 且来自天然不易获得耐药性。我们观察了野艾活性部位对*H. pylori*的体外抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 *H. pylori*标准菌株NCTC11637购于中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, NCTC11638、26695由上海第二医科大学郭晓奎教授惠赠。另将江苏石油勘探局职工总医院胃镜室提供的慢性浅表性胃炎、胃溃疡和胃癌患者胃黏膜活检标本, 直接接种在脑心浸液血液琼脂平板上, 经过微氧环境培养, 分离出*H. pylori*菌落, 经观察菌落、细菌形态及尿素酶、触酶、氧化酶试验, 鉴定为幽门螺杆菌。依次编号为1, 2, 3, 保存备用。用NCTC11637(甲硝唑MIC为1 mg/L)作为标准的*H. pylori*质控菌株。采用脑心浸液琼脂(含80-100 mL/L的脱纤维羊血+万古霉素、两性霉素、TMP、多黏菌素B), pH 7.2。抽气换气法形成微氧环境(N₂ 850 mL/L, CO₂ 100 mL/L, O₂ 50 mL/L), 于恒温培养箱37℃条件下培养。脑心浸液琼脂培养基为美国Becton Dickinson产品。野艾端午节前后采于湖北蕲县。经南京中医药大学中药学院吴启南教授鉴定为野艾*A. lavandulaefolia* DC, 鉴定方法参照文献[18]。取野艾适量, 以950 mL/L乙醇浸渍后渗漉, 得到950 mL/L乙醇渗漉液和残渣。将950 mL/L乙醇渗漉液减压浓缩至稠膏, 得醇提总浸膏。将总浸膏依次用正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、950 mL/L乙醇连续提取, 首次提取加入正己烷, 搅拌溶解后, 过滤, 不溶物再以正己烷连续提取

■背景资料

幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤和胃癌密切相关, 目前使用的治疗方案存在着耐药性的不断增加和首次感染治疗失败后的再治疗以及治疗过程中产生的副反应和病人的不顺从性等诸多问题, 寻找高效、低毒、廉价的抗*H. pylori*药物, 特别是从中药中寻找新型抗*H. pylori*药物引人注目。

■研发前沿

近年来, 随着大量广谱抗生素的广泛应用使得耐药的幽门螺杆菌菌株呈不断上升趋势, 开发抗*H. pylori*药物已经成为全球关注的课题。对中药抗*H. pylori*活性组分的筛选相关研究将成为热点。

■创新盘点

近十余年来国内外进行了大量中药抗*H pylori*的研究,取得了可喜的成果,但中药研究的制剂大多为水煎剂,对中药抗*H pylori*活性部位的筛选和相关实验研究报道还很罕见。本课题应用中药提取分离方法把野艾分成正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇等4个组分,证实了野艾抗*H pylori*活性组分为野艾的乙酸乙酯提取物。

表 1 野艾提取物的体外抑制*H Pylori*的实验结果

药物	NCTC11637	NCTC11638	26695	1	2	3
YA-1	+	+	+	+	+	+
YA-2	-	+	+	+	-	-
YA-3	-	-	-	-	-	-
YA-4	-	-	-	-	-	-
YA-5	-	-	-	-	-	-
YA-6	-	-	-	-	-	-
YA-7	-	-	-	-	-	-
YA-8	-	-	-	-	-	-
YB-1	+	+	+	+	+	+
YB-2	-	-	-	-	+	-
YB-3	-	-	-	-	-	-
YB-4	-	-	-	-	-	-
YB-5	-	-	-	-	-	-
YB-6	-	-	-	-	-	-
YB-7	-	-	-	-	-	-
YB-8	-	-	-	-	-	-
YC-1	+	+	+	+	+	+
YC-2	+	+	+	+	+	+
YC-3	+	+	+	+	+	+
YC-4	-	-	+	-	+	-
YC-5	-	-	-	-	-	-
YC-6	-	-	-	-	-	-
YC-7	-	-	-	-	-	-
YC-8	-	-	-	-	-	-
YD-1	+	+	+	+	+	+
YD-2	+	+	+	+	+	+
YD-3	+	-	-	+	+	-
YD-4	-	-	-	-	-	-
YD-5	-	-	-	-	-	-
YD-6	-	-	-	-	-	-
YD-7	-	-	-	-	-	-
YD-8	-	-	-	-	-	-
YE-1	-	-	-	-	-	-
YE-2	-	-	-	-	-	-
YE-3	-	-	-	-	-	-
YE-4	-	-	-	-	-	-
YE-5	-	-	-	-	-	-
YE-6	-	-	-	-	-	-
YE-7	-	-	-	-	-	-
YE-8	-	-	-	-	-	-

“+”菌株被抑制,“-”菌株生长。

二次,合并滤液得到提取物的正己烷可溶性部分。不溶于正己烷的残留物按上述方法依次用乙酸乙酯、正丁醇、乙醇提取。将以上提取四部分减压除去有机溶剂,50℃真空干燥2 h,回收溶剂得正己烷提取物、乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物、乙醇提取物。取各提取物适量,用生理盐水配成所需浓度,脂溶剂以二甲基亚砜(DMSO)助溶,DMSO最终浓度小于0.5 g/L。过滤除菌,4℃保存备用。野艾总浸膏、正己烷提取物、乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物、乙醇提取物分别编号为YA, YB, YC, YD, YE。

1.2 方法 按照美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)制定的琼脂稀释法^[19-21]进行药敏试验。用*H pylori*培养基将野艾提取物YA, YB,

YC, YD, YE试验液进行倍比稀释成终浓度为10.24 g/L、5.12 g/L、2.56 g/L、1.28 g/L、0.64 g/L、0.32 g/L、0.16 g/L、0.08 g/L,制备成含不同浓度中药的血琼脂平板,并分别编号YA-1~YA-8, YB-1~YB-8, YC-1~YC-8, YD-1~YD-8, YE-1~YE-8。同时以空白不含中药的培养基作为对照。按0.25 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、2 mg/L、4 mg/L、8 mg/L的甲硝唑终浓度制备*H pylori*血琼脂平板。将受试菌在*H pylori*培养基血平板上传种3次以保证其纯度及活力,得到的72 h菌龄的菌株,将各菌株用生理盐水洗下,稀释成 10^{11} CFU/L(1麦氏浓度)浓度菌液,取菌液1 μL涂布药物平皿,每一菌株重复3块平板。其中,含甲硝唑琼脂平板只涂布NCTC11637菌株。于37℃微需氧环境下培养3 d。观察细菌生长情况,以不出现菌落的平板上的最低药物浓度为最低抑菌浓度(MIC)。

2 结果

NCTC11637菌株对甲硝唑的MIC为1 mg/L;空白对照组6种菌株均生长良好。野艾总浸膏的MIC为10.24 g/L,野艾正己烷提取物的MIC为10.24 g/L,野艾乙酸乙酯提取物的MIC为2.56 g/L,野艾正丁醇提取物5.12 g/L,野艾乙醇提取物的MIC>10.24 g/L(表1)。

3 讨论

*H pylori*是慢性胃炎、消化性溃疡和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的重要致病因子,*H pylori*与胃癌的发生有关,根除*H pylori*能使胃黏膜炎症消退、溃疡愈合、MALT缓解。目前常用的一线治疗方案大体上可分为质子泵抑制剂(PPI)为基础和铋剂为基础的两种方案。通常由一种PPI或一种铋剂配上克拉霉素、阿莫西林或甲硝唑三种抗生素中的两种组成三联疗法^[22-24]。但*H pylori*的西药治疗副作用发生率高(5%-20%),依从性差,停药后复发率高,长期联合应用抗生素的安全性值得重视,易引起肠道菌群紊乱,而且由于治疗*H pylori*感染方案的广泛使用,*H pylori*耐药性趋势也在增长,研究显示不同国家和地区分离出的*H pylori*菌株均已产生不同程度的耐药^[25-28]。

艾叶芳香,其性味辛、苦、温,归肝、脾、肾经,具有散寒止痛、温经止血、理气安胎的功能。最早见于汉代张仲景《金匱要略》中的芎归胶艾汤(后改为胶艾四物汤)用以治疗妇女“崩漏”病,一直沿用至今。随后历代医家对艾叶的

使用范围越来越宽, 包括虚寒性子宫出血, 月经不调, 胎漏下血, 痛经, 带下, 腹痛, 皮肤瘙痒, 消化道肿瘤, 肺癌, 甲状腺肿瘤, 胰腺癌等症. 艾叶经加工成“艾绒”是针灸治病的好材料. 民间还用艾叶温汤洗浴, 驱除蚊蝇, 熏蒸治病, 包粽子, 蒸饼, 做饺子, 制青团以及制茶^[29].

现代药物化学分析, 艾叶含有软性树脂, 挥发性精油, 鞣酸, 葡萄糖, 氯化钾和维生素B、C等成分. 大量的药理研究表明艾叶对金黄色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、大肠杆菌、白喉杆菌、伤寒及副伤寒杆菌、绿脓杆菌、枯草杆菌以及结核杆菌等多种细菌均有杀灭或抑制作用^[29]. 但艾叶提取物对*H pylori*的研究国内外报道还很罕见. 对艾叶抑制*H pylori*的活性部位的研究还处于空白.

为研究*H pylori*对艾叶的敏感性, 给患者提供较为理想的*H pylori*根除药物, 必须进行药物敏感性试验. 药物敏感性试验常使用MIC这一指标, 较低的MIC表示此种药物更容易抑制此种微生物. 目前*H pylori*的药物敏感性试验方法很多, 常用的方法有琼脂稀释法、纸片扩散法和E试验, 在这些试验技术中琼脂稀释法是要求最高的, 也是唯一被美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)和美国食品及药品管理局(FDA)批准的试验方法.

野艾常作“艾叶”入药, 我们选取野艾为研究对象, 通过琼脂稀释法观察了野艾提取物抑制*H pylori*的最低抑菌浓度, 明确了野艾的乙酸乙酯提取物具有较强的抑制*H pylori*生长的作用. 野艾的毒性较低^[30], 以及野艾制剂在肿瘤临床的应用, 为我们进一步研究野艾活性成分在抗*H pylori*的领域研究创造了可能.

4 参考文献

- van Amsterdam K, van Vliet AH, Kusters JG, van der Ende A. Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30: 131-156
- Malfertheiner P, Peitz U. The interplay between *Helicobacter pylori*, gastro-oesophageal reflux disease, and intestinal metaplasia. *Gut* 2005; 54: i13-i20
- Peek RM Jr, Crabtree JE. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *J Pathol* 2006; 208: 233-248
- Ma JL, Zhang L, Pan KF, Liu WD, Feng GS, You WC. *Helicobacter pylori* and the progression of gastric cancer: a 10-year cohort study. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 2758-2761
- Chen LT, Lin JT, Tai JJ, Chen GH, Yeh HZ, Yang SS, Wang HP, Kuo SH, Sheu BS, Jan CM, Wang WM, Wang TE, Wu CW, Chen CL, Su IJ, Whang-Peng J, Cheng AL. Long-term results of anti-*Helicobacter pylori* therapy in early-stage gastric high-grade transformed MALT lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1345-1353
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, Graham DY, Tytgat G. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 167-180
- 中华医学会消化病学分会. 对幽门螺杆菌若干问题的共识意见(2003·中国). *中华医学杂志* 2004; 84: 522-523
- 姜英杰, 李瑜元, 聂玉强, 王红, 沙卫红. 根除幽门螺杆菌疗效与细胞色素氧化酶P450 2C19基因多态性的关系. *中华消化杂志* 2005; 25: 458-461
- 盛颖, 吴力军, 董国芳, 宗春华. 艾司奥美拉唑、克拉霉素和阿莫西林三联疗法根除幽门螺杆菌的疗效. *中国新药与临床杂志* 2004; 23: 820-822
- Winter TA, Kidd M, Kaye P, Marks IN. Gastric and duodenal mucosal protein fractional synthesis and growth factor expression in patients with *H pylori*-associated gastritis before and after eradication of the organism. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 925-930
- Lu B, Chen MT, Fan YH, Liu Y, Meng LN. Effects of *Helicobacter pylori* eradication on atrophic gastritis and intestinal metaplasia: a 3-year follow-up study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6518-6520
- Pregun I, Herszenyi L, Juhasz M, Miheller P, Tulassay Z. Is successful *Helicobacter pylori* eradication sufficient to heal peptic ulcer? *Orv Hetil* 2006; 147: 435-439
- 蒋振明, 徐国纓, 张存钧, 蒋勇, 张镜人. 中药复方对幽门螺杆菌抑菌作用的体外实验. *中国中西医结合消化杂志* 2001; 9: 101-102
- 杜平华, 朱世真, 吕品. 20种中药材对幽门螺杆菌体外抗菌活性的研究. *中药材* 2001; 24: 188-189
- 刘波, 李雪松, 徐和利, 王海岩, 赵静玫, 孙艳, 杨晓明, 谷源平, 杨玉龙. 5种中药制剂杀灭幽门螺杆菌的实验研究. *中国新药杂志* 2002; 11: 457-459
- 李长军, 李国成, 黄祎, 罗树星. 健脾益气中药对消化性溃疡患者*H pylori*及HSP60的影响. *中国临床医学* 2002; 9: 101-102
- 唐小梅, 伍参荣. 中药抗幽门螺杆菌感染的研究. *中医药学刊* 2003; 21: 1707-1708
- 陈宗良, 张慧芳. 艾叶、野艾及细叶艾的比较鉴别. *中药材* 1999; 22: 235-237
- 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 第1版. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 309-310
- Best LM, Haldane DJ, Keelan M, Taylor DE, Thomson AB, Loo V, Fallone CA, Lyn P, Smaill FM, Hunt R, Gaudreau C, Kennedy J, Alfa M, Pelletier R, Veldhuyzen Van Zanten SJ. Multilaboratory comparison of proficiencies in susceptibility testing of *Helicobacter pylori* and correlation between agar dilution and E test methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3138-3144
- 王辉, 高屹, 陈民钧. 简介美国NCCLS药敏试验法规范(1999年1月版)的变动部分. *中华医学检验杂志* 1999; 22: 318-320
- Scarpignato C. Towards the ideal regimen for *Helicobacter pylori* eradication: the search continues. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 243-247
- Bytzer P, O'Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2005; 10: 40-46
- 周殿元, 陈焯. 幽门螺杆菌感染的药物治疗新进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 157-159

■应用要点

野艾的乙酸乙酯提取物抑制幽门螺杆菌的最低抑菌浓度为2.56 g/L, 具有较强的抑制*H pylori*生长的作用, 为进一步开发野艾的药用价值提供了资料.

■同行评价

有关幽门螺杆菌的基础和临床研究是消化系疾病的研究热点之一。由于幽门螺杆菌对很多抗生素存在耐药性,其治疗的根除率、清除率等近年来呈下降趋势。目前,深入探讨幽门螺杆菌的耐药机制、寻找有效的治疗幽门螺杆菌感染的药物,是有关幽门螺杆菌基础和临床研究所急需解决的问题。本研究提取中药艾叶的有效活性成分,用于幽门螺杆菌体外抑制实验,具有一定的创新性。

- 25 McMahon BJ, Hennessy TW, Bensler JM, Bruden DL, Parkinson AJ, Morris JM, Reasonover AL, Hurlburt DA, Bruce MG, Sacco F, Butler JC. The relationship among previous antimicrobial use, antimicrobial resistance, and treatment outcomes for *Helicobacter pylori* infections. *Ann Intern Med* 2003; 139: 463-469
- 26 成虹, 胡伏莲. 北京地区幽门螺杆菌耐药情况及其变化趋势. *中华医学杂志* 2005; 85: 2754-2757
- 27 Elviss NC, Owen RJ, Xerry J, Walker AM, Davies K. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance patterns and genotypes in adult dyspeptic patients from a regional population in North Wales. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 435-440
- 28 Fallone CA. Epidemiology of the antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Canada. *Can J Gastroenterol* 2000; 14: 879-882
- 29 郑汉臣, 魏道智, 黄宝康, 辛海量, 秦路平. 艾叶的民俗应用与现代研究. *中国医学生物技术应用杂志* 2003; 2: 35-39
- 30 梅全喜. 艾叶的药理作用研究概况. *中草药* 1996; 27: 311-314

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信), 免收出版费, 写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言; 1 诊断; 2 治疗; 3 特色; 4 门诊时间

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

技法与经验

本刊讯 《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏, 及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验。我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿, 免费刊登照片。写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法: 1.1 原理; 1.2 适应证; 1.3 器材准备; 1.4 步骤; 1.5 实例

2 结果

3 讨论: 3.1 并发症; 3.2 优点和缺点; 3.3 经验与技巧

4 参考文献

胆管结石患者术后经“T”管窦道胆道镜Oddi括约肌测压的表现及意义

田 忠, 吴硕东, 孔 静, 张振海

田忠, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)第二微创胆道外科 辽宁省沈阳市 110003

吴硕东, 孔静, 张振海, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)第一微创胆道外科 辽宁省沈阳市 110003

通讯作者: 吴硕东, 110003, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)第一微创胆道外科. gall2000@tom.com
电话: 024-83955279 传真: 024-86540367

收稿日期: 2006-03-15 接受日期: 2006-04-06

Choledochoscopic manometry research of the sphincter of Oddi motility in bile duct stone patients with a T tube after operation

Zhong Tian, Shuo-Dong Wu, Jing Kong, Zhen-Hai Zhang

Zhong Tian, the Second Department of Micro-invasive and biliary surgery, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China

Shuo-Dong Wu, Jing Kong, Zhen-Hai Zhang, the First Department of Micro-invasive and Biliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China

Correspondence to: Shuo-Dong Wu, the First Department of Micro-invasive and Biliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China. gall2000@tom.com

Received: 2006-03-15 Accepted: 2006-04-06

Abstract

AIM: To study the sphincter of Oddi (SO) motility by choledochoscopic manometry, and to investigate the manometric appearance of sphincter of Oddi disorders and its relationship with bile duct stones.

METHODS: Two hundred and sixteet patients who had a T tube after operation were assessed by choledochoscopic manometry. SO basal pressure (SOBP), amplitude of SO contractions (SOCA), frequency of SO contractions (SOCF), duration of SO contractions (SOCD), duodenal pressure (DP), common bile duct pressure (CBDP), and the percentage of propagate directions were scored and analyzed. The patients

were divided into 4 groups according to the levels of sphincter of Oddi basal pressure: group A (sphincter of Oddi hypomotility), group B (normal SOPB), group C (SOBP a little higher than normal) and group D (sphincter of Oddi dysfunction).

RESULTS: The mean SOCA in group A was 62.32 ± 32.13 mmHg, much lower than that in the other three groups ($P < 0.01$); the mean SOCD in group A was shorter than that in group B and group C ($P < 0.01$); the mean SOCF in group A had no significant difference from that in group B and group C, but lower than that in group D ($P < 0.05$); the mean CBDP in group A was 3.89 ± 8.10 mmHg, much lower than that in group D ($P < 0.01$), but higher than SOBP. The SOCA in group D was 97.02 ± 51.76 mmHg, apparently higher than that in group A ($P < 0.01$), which was not significantly different from that in group B and group C, but with a tendency to increase; the mean SOCD in group D was shorter than that in group C ($P < 0.05$), and there was no apparent difference between the other two groups; the mean SOCF in group D was markedly higher than that in the other three groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); the mean CBDP in group D was 10.41 ± 12.37 mmHg, higher than that in group A and B ($P < 0.01$), but was not statistically different from that in group C; the percentage of retrograde peristalsis in group D ($35.73\% \pm 26.38\%$) was notably higher than that in group A ($20.31\% \pm 21.96\%$) and B ($22.71\% \pm 23.86\%$) ($P < 0.05$).

CONCLUSION: SO dysfunction and hypomotility exist in bile duct stone patients after operation, which can be diagnosed effectively by choledochoscopic manometry. The SO disorders may be associated with the formation or/and recurrence of bile duct stones.

Key Words: Sphincter of Oddi; Dysfunction; Hypomotility; Choledochoscope; Manometry

Tian Z, Wu SD, Kong J, Zhang ZH. Choledochoscopic

■背景资料

SO功能的研究为胆道动力学研究的主要内容, SO测压已成为公认的研究SO功能的全标准. SO的功能异常可能与多种胆道疾病有关系, 一方面可能表现为由SO的功能异常存在引起胆道疾病出现, 另一方面也可能由于胆道疾病的存在而引起SO的功能异常. 胆道外科手术以及内镜治疗都可引起SO功能的变化, 进而影响胆道动力学的变化, 其中胆管结石与SO的关系最为密切.

■研究前沿

SO运动功能不足文献中罕见报道,其存在可能与肠胆返流有关,但其具体形成原因及对胆道动力学的具体影响有待于进一步研究。

manometry research of the sphincter of Oddi motility in bile duct stone patients with a T tube after operation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(11):1119-1123

摘要

目的: 对胆管结石患者术后经“T”管窦道行胆道镜测压,研究胆管结石患者术后Oddi括约肌(SO)功能,探讨结石与SO功能变化的关系。

方法: 共对216例患者测量十二指肠压、Oddi括约肌基础压、收缩幅度、收缩频率、收缩间期、胆总管压以及顺蠕动、逆蠕动及同时收缩所占百分比。对患者根据SO基础压分为4组: A组(SO运动功能不足组)、B组(SO压力正常组)、C组(SO压力略升高组)和D组(SO功能障碍组),比较各组各测压指标之间差别。

结果: A组SO收缩幅度均值为 62.32 ± 32.13 mmHg,较其他三组明显降低($P < 0.01$); SO收缩间期较B、C组明显缩短($P < 0.01$); 收缩频率与B、C组的差异无统计学意义,但明显小于D组($P < 0.05$); 胆总管压均值为 3.89 ± 8.10 mmHg,较B、C组差异无统计学意义,但是明显低于D组($P < 0.01$),而且大于SO基础压。D组SO收缩幅度均值为 97.02 ± 51.76 mmHg,与B、C组差异虽无统计学意义,但呈升高趋势,而且明显高于A组($P < 0.01$); SO收缩间期较C组短($P < 0.05$),与另外两组差异无统计学意义; SO收缩频率较前三组则明显增快($P < 0.01$ vs A, B组, $P < 0.05$ vs C组); 胆总管压均值为 10.41 ± 12.37 mmHg,较A、B组明显升高($P < 0.01$),与C组差别无统计学意义; 逆蠕动所占百分比与A、B组相比明显增加($35.73\% \pm 26.38\%$ vs $20.31\% \pm 21.96\%$, $22.71\% \pm 23.86\%$, $P < 0.05$),与C组差别无统计学意义。

结论: 胆管结石患者术后存在SO功能障碍及SO运动功能不足两种病理状况,而且SO的这些异常改变可能与胆管结石的形成和/或复发有关。经T型管窦道胆道镜测压可以作为诊断SO功能障碍及SO运动功能不足的有效手段。

关键词: Oddi括约肌; 功能障碍; 运动功能不足; 胆道镜; 测压

田忠, 吴硕东, 孔静, 张振海. 胆管结石患者术后经“T”管窦道胆道镜Oddi括约肌测压的表现及意义. *世界华人消化杂志* 2006;14(11):1119-1123

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1119.asp>

0 引言

位于胆胰管末端十二指肠壁内的Oddi括约肌

(sphincter of Oddi, SO), 在胆道动力系统中发挥重要生理功能, 调控胆汁及胰液流入十二指肠, 阻止十二指肠内容物反流入胆胰管而起到阀门作用。SO功能发生异常可引起胆道动力异常, 多种胆道疾病的发生可能与之有关。对SO进行压力测定, 是研究其功能变化的重要手段, 本文则通过对胆管结石患者术后经“T”管窦道行胆道镜测压, 研究胆管结石患者术后SO功能, 进而探讨结石与SO功能变化的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2002-03/2005-06在我院外科住院的216例胆管结石患者, 其中男105例, 女111例, 平均年龄55.5岁(35-77岁), 全部患者均行胆管探查取石及“T”管引流术, 手术后至平均2 mo(1.5-4 mo)来拔管或取残石, 在操作过程中进行了测压研究。

1.2 方法

1.2.1 测压系统、原理及方法 测压器械为PC polygram HR高分辨、多通道胃肠功能测定仪及相应测压软件、三通道测压导管、低顺应性水灌注系统、氮气泵及PENTEX LX-750p纤维胆道镜。三通道测压导管长2 m, 直径1.7 mm, 末端有三个侧孔, 相隔2 mm, 每孔开口于不同方向。受试者检查前2 d不使用对胆道压力有影响的药物, 禁食一夜。设置电脑测压系统参数, 氮气压力为40 kPa, 水流速度为0.5 mL/min, 连接测压导管, 经T型管窦道导入胆道镜, 观察乳头部是否蠕动良好、有无狭窄及纤维化及结石取石后, 由胆道镜侧孔插入测压导管, 直视下经乳头达十二指肠, 稳定30 s后测压, 后拽导管至SO部, 直视结合电脑出现时相波可明确导管处于SO内, 测压后导管后拽至胆总管内行测压并存储曲线。

1.2.2 分组及观察参数 按照Tondelli *et al*^[1]定义, 对患者根据SO基础压进行了分组, < 5 mmHg为A组(SO运动功能不足组), 5-15 mmHg为B组(SO压力正常组), 15-30 mmHg为C组(SO压力略升高组), > 30 mmHg为D组(SO功能障碍组)。观察参数包括SO基础压、收缩频率、收缩幅度、收缩间期、十二指肠压及胆总管压和顺蠕动、逆蠕动及同时收缩所占百分比。

统计学处理 采用SPSS 11.5统计软件包进行分析, 本研究统计学资料均为正态分布计量资料, 结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 样本均数间比较使用独立样本 t 检验。

表 1 各组之间收缩时相等指标变化

	SO收缩幅度 (mmHg)	收缩间期 (s)	收缩频率 (个/min)	胆总管压 (mmHg)
A组 (n = 70)	62.32 ± 32.13 ^{ac}	4.91 ± 1.48 ^a	7.48 ± 3.00 ^c	3.89 ± 8.10 ^c
B组 (n = 100)	84.37 ± 40.86	5.58 ± 1.36	7.75 ± 2.55 ^e	4.13 ± 4.30 ^{de}
C组 (n = 29)	85.91 ± 36.93 ^b	6.12 ± 1.85 ^b	8.23 ± 2.77	6.80 ± 6.39
D组 (n = 17)	97.02 ± 51.76	5.01 ± 1.42 ^f	10.58 ± 3.89 ^f	10.41 ± 12.37

^a*P*<0.01(A组 vs B组), ^b*P*<0.01(A组 vs C组), ^c*P*<0.01(A组 vs D组), ^d*P*<0.05(B组 vs C组), ^e*P*<0.01(B组 vs D组), ^f*P*<0.05(C组 vs D组).

2 结果

2.1 分组情况 经过对216名患者进行测压研究, 均获得了清晰的测压曲线, 进行一次测压并使用*t*检验分析测压结果. 其中A组70例, 基础压均值为1.97 mmHg, 占32.41%, 为SO运动功能不足组; 基础压为5-15 mmHg者100例, 基础压均值为8.56 mmHg, 占46.3%, 为压力正常组; C组29人, 基础压均值为20.25 mmHg, 占13.43%, 为SO压力略升高组; D组17人, 基础压均值为46.08 mmHg, 占7.87%, 为SO功能障碍组.

2.2 各组间收缩时相等指标变化 A组SO收缩幅度较其他三组明显降低(*P*<0.01); SO收缩间期较B, C组明显缩短(*P*<0.01); 收缩频率与B, C组的差异无统计学意义, 但明显小于D组(*P*<0.05); 胆总管压较B, C组差异无统计学意义, 但是明显低于D组(*P*<0.01), 而且大于SO基础压. B, C二组间除胆总管压C组较高外(*P*<0.05), 其他指标变化无统计学意义. D组SO收缩幅度与B, C组差异虽无统计学意义, 但呈升高趋势, 而且明显高于A组(*P*<0.01); SO收缩间期较C组短(*P*<0.05), 与另外两组差异无统计学意义; SO收缩频率较前三组则明显增快(*P*<0.01 vs A, B组, *P*<0.05 vs C组); 胆总管压较A, B组明显升高(*P*<0.01), 与C组差别无统计学意义(表1).

2.3 各组间顺逆蠕动所占百分比比较 除C组同时收缩所占百分比比较B组明显较少外(*P*<0.05), 各组间蠕动方向所占百分比无明显差异. 但D组有顺蠕动减少, 逆蠕动增加的趋势, 并且其逆蠕动所占百分比与A, B组相比明显增加(*P*<0.05), 与C组差别无统计学意义(表2).

3 讨论

1887年, Ruggero Oddi首先提出胆总管末端存在括约肌的机制, 并命名为Oddi括约肌(sphincter of Oddi, SO). SO的功能与十二指肠肌独立, 同时拥有一个变化的基础压和周期性的收缩活动,

表 2 各组间顺逆蠕动所占百分比

	顺蠕动 (%)	同时收缩 (%)	逆蠕动 (%)
A组 (n = 70)	63.08 ± 28.15	15.61 ± 19.07	20.31 ± 21.96
B组 (n = 100)	58.64 ± 29.62	18.64 ± 21.92	22.71 ± 23.86
C组 (n = 29)	67.34 ± 25.85	8.67 ± 14.67 ^c	23.98 ± 22.81
D组 (n = 17)	49.60 ± 33.25	14.67 ± 14.21	35.73 ± 26.38 ^{ab}

^a*P*<0.05(A组 vs D组), ^b*P*<0.05(B组 vs D组), ^c*P*<0.05(B组 vs C组).

并与十二指肠移行复合波有关^[2-3]. SO最主要的作用是调节胆汁及胰液排泄并防止十二指肠液反流, 其在胆道动力学中发挥决定性的作用. SO功能性异常和器质性改变均可引起胆道动力学变化.

SO功能障碍(SO dysfunction, SOD)是指因SO的收缩功能异常而导致位于胆胰管结合处的胆汁或胰液流出梗阻. 其主要临床表现为胆样或胰样疼痛、胰腺炎及肝功能或胰腺酶学异常. SOD包括两方面内容: SO运动功能不良和SO狭窄. SO运动功能不良(SO dyskinesia)是指SO高压区的间歇性的功能性阻滞, SO痉挛、肥厚和去神经化可导致其发生. 表现为SO基础压升高, 但可被平滑肌松弛剂降低; SO狭窄(SO stenosis)是指由于慢性炎症或纤维化导致SO部分或全部狭窄而导致SO的结构发生异常, 与胰腺炎、胆囊结石经过乳头时的损伤、术中胆总管探查创伤或非特异性炎症条件有关.

SO运动功能不足文献中报道较少, Deng *et al*^[4]研究发现胃手术十二指肠横断后SO收缩幅度减小, 收缩频率减慢, 基础压降低, 并推测SO功能异常与肠胆反流及胃术后胆结石形成有关. Allescher *et al*^[5]报道一例慢性小肠假性梗阻患者SO运动功能不足同时存在胆道积气, 其基础压及收缩幅度较对照组明显降低, 但收缩频率正常. 研究亦发现进行性全身性硬化病患者SO基

■创新盘点

关于SO功能异常的研究, 目前关注的焦点仍是SOD, 本研究为迄今为止样本量最大的应用胆道镜测压对胆管结石SO的功能进行检测并探讨胆管结石患者术后SO功能异常存在的种类及与胆管结石形成和复发的关系, 并首次提出SO运动功能不足的定义.

■应用要点

术后经胆道镜测压采用与ERCP时测压相同的测压原理、系统及软件,为微创检查,可直接观察SO形态并进行长时间测压,逆行插管成功率高,可避免许多并发症,可以有效地评价患者术后SO功能的状态,发现SO功能异常的存在,指导临床进一步治疗。

础压及收缩幅度降低^[6]。理论上与SO运动功能不足密切相关的因素有手术后黏连牵拉SO,腹腔脓肿,胰腺炎,肿瘤导致的SO关闭不全,十二指肠逆蠕动,括约肌内在神经功能紊乱,结石通过,药物作用以及手术和内镜下的括约肌切开等。

胆道动力学的研究被临床所接受这一过程是缓慢的,但随着X线、超声、内镜技术和测压及核素显像等技术不断应用到胆道动力学的研究,人们对功能性胆道疾病的认识也不断增强,SO功能的研究也逐渐增多,并且成为胆道动力学研究的主要内容。研究SO功能的方法主要有:实验室检查,吗啡-新斯的明激发实验,超声检查,核素显像及SO测压等。其中SO测压已成为公认的研究SO功能的金标准。胆总管探查术中、术后经“T”管窦道测压和行ERCP时经内镜测压较为常用。术后经胆道镜测压采用与ERCP时测压相同的测压原理、系统及软件,为微创检查,可直接观察SO形态并进行长时间测压,病例充足,易获得患者的同意和配合,逆行插管成功率高,可避免许多并发症,但仅适用于胆管结石术后行“T”管引流者。检查过程中生理盐水冲洗及测压过程中“T”管窦道处于非完全封闭状态等因素是否影响SO动力尚属未知。

在一般正常对照的ERCP时测压研究显示,胆总管压较十二指肠压高约5-15 mmHg,主胰管压与胆总管压基本相同。SO基础压较胆总管压高约5-15 mmHg,较十二指肠压高约15-30 mmHg。在SO基础压上产生时相性收缩,收缩振幅为50-150 mmHg,频率为3-8次/min。传播方向多为顺行性传播。SO基础压通常被认为是诊断SOD的最可靠的测压指标,其临界值为30-40 mmHg,当大于40 mmHg时诊断为SOD。Toouli *et al*^[7]对48例可疑SOD患者进行内镜下测压研究显示,其大多存在SO测压异常,包括:逆蠕动增加,收缩频率增快,基础压升高及对奥曲肽反应异常等。而经“T”管窦道测压由于其处于非完全封闭状态等因素及研究人群的特殊性使其测压值较ERCP时测压偏低,本实验216例测压基础压均值为10.95 mmHg。1983年,Tondelli *et al*^[1]对SOD所定的“T”管流体压力为胆总管压力大于16 mmHg及括约肌压力大于30 mmHg。

本实验按照Tondelli定义将SO基础压大于30 mmHg者定义为SOD,而把基础压小于5 mmHg者定义为SO运动功能不足,基础压5-15 mmHg者为压力正常对照,而15-30 mmHg

者为压力略升高组。由于对带有“T”管人群SO运动功能不足及正常对照无明确的测压定义,本标准可能亦有失偏颇,值得商榷。

SO的功能异常可能与多种胆道疾病有关系,一方面可能表现为由SO的功能异常存在引起胆道疾病出现,另一方面也可能由于胆道疾病的存在而引起SO的功能异常。胆道外科手术以及内镜治疗都可引起SO功能的变化,进而影响胆道动力学的变化,其中胆管结石与SO的关系最为密切。

本研究发现SOD患者共17人,发生率为7.87%。其测压表现除基础压升高(46.08 mmHg)外,收缩频率较前三组明显增快,胆总管压较A、B两组明显升高,收缩幅度较A组明显升高。与以往研究不同的是,本实验未发现逆蠕动增加并超过总数的50%,但所占比例有增高趋势,有研究提示SO的逆向蠕动与胆总管结石的形成有关^[8-9]。收缩间期的变化特点为C组最长,可能是因为A组SO运动功能不足收缩波矮小,而D组患者基础压升高,收缩频率增快有关。经T型管窦道测压与ERCP时测压途径,方法及对象的不同可能是造成其测压结果相差较大的原因。SOD的存在与胆管结石有着互为因果的关系,SOD时较高的SO基础压影响着胆汁的流动,可造成胆汁淤积进而形成结石^[8];胆管结石的存在可以造成胆管末端的炎性狭窄,引起SOD的出现^[10]。

SO运动功能不足组共70例,基础压均值为1.97 mmHg,发生率为32.41%,远远高于SOD的发生率。人们关注SOD是缘于对胆囊切除术后仍然出现胆绞痛的探索,但是对于胆管结石术后出现的SO基础压低并且小于胆总管压、收缩幅度减小、收缩间期短等为主要表现SO异常却很少提及。在本研究中,我们命名为SO运动功能不足(sphincter of Oddi hypomotility),因其没有像SOD那样会引起一些明显临床症状而不被注意,以致于忽略了其存在的可能。但是在临床实际工作中会经常遇到这样的情况:许多肝内外胆管结石患者其胆道末端出口非常宽敞通畅,术中胆道镜可以轻松自由通过,而肝内外胆管却扩张,提示这部分患者原本可能就存在SO运动功能不足。当SO运动功能不足时,便失去了对胆汁排泄所起的单向阀门作用,从而使十二指肠内容物易于反流至胆管或胰管内,而肠道内细菌反流入胆道可促使结石形成,已有研究证实胆管结石术后存在十二指肠胆道返流^[11]。因此SO运动功能不足也可能是胆管结石反复

发的一个原因, 应该尽可能的保留和保护SO的功能.

另外目前定义的SO功能障碍(SOD)是指SO的基础压大于40 mmHg, 但根据本研究的结果, 我们认为其只是SO异常的一个方面, 称之为SO运动功能亢进(sphincter of Oddi hypermotility)或过剩可能更能符合实际情况. 关于这一问题以及SO运动功能不足在胆道动力学中的具体影响, 都有待于进一步的研究和明确.

通过本研究我们认为, 胆管结石患者术后存在SO功能障碍及SO运动功能不足两种病理状况, 各有其特异的测压表现, 而且SO的这些异常改变可能与胆管结石的形成和/或复发有关. 经T型管窦道测压可以作为诊断SO功能障碍及SO功能不良的有效手段.

4 参考文献

- 1 Tondelli P, Gyr K. Biliary tract disorders. Postsurgical syndromes. *Clin Gastroenterol* 1983; 12: 231-254
- 2 Kher K, Guelrud M. Normal sphincter of oddi motor function. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6: 163-168
- 3 Woods CM, Mawe GM, Tooouli J, Saccone GT. The sphincter of Oddi: understanding its control and function. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 31-40
- 4 Deng ZL, Nabae T, Konomi H, Takahata S, Yokohata K, Ogawa Y, Chijiwa K, Tanaka M. Effects of proximal duodenal transection and anastomosis on interdigestive sphincter of Oddi cyclic motility in conscious dogs. *World J Surg* 2000; 24: 863-869
- 5 Allescher HD, Safrany L, Neuhaus H, Feussner H, Classen M. Aerobilia and hypomotility of the sphincter of Oddi in a patient with chronic intestinal pseudo-obstruction. *Gastroenterology* 1992; 102: 1782-1787
- 6 Hagenmuller F, Classen M. Motility of Oddi's sphincter in Parkinson's disease, progressive systemic sclerosis, and achalasia. *Endoscopy* 1988; 20: 189-192
- 7 Tooouli J, Roberts-Thomson IC, Dent J, Lee J. Manometric disorders in patients with suspected sphincter of Oddi dysfunction. *Gastroenterology* 1985; 88: 1243-1250
- 8 Blaut U, Marecik J, Thor PJ. Sphincter of Oddi motility disturbances-etiological factor or the consequence of choledocholithiasis. *Folia Med Cracov* 1999; 40: 93-105
- 9 Ugljesic M, Bulajic M, Milosavljevic T, Stimec B. Endoscopic biliary manometry in cholecystectomized patients with and without choledocholithiasis. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 651-655
- 10 Tanaka M. Advances in research and clinical practice in motor disorders of the sphincter of Oddi. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 564-568
- 11 Sun SL, Wu SD, Zhang XB. Oral (99m)Tc-DTPA simultaneous determination of duodenobiliary reflux and intestinal permeability in patients after choledocholithotomy plus T-tube drainage. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 593-596

电编 张敏 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2006 年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录.

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章.

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元.欢迎广大消化科医务人员及科教人员、各大图书馆订阅.联系地址: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

补脾清肠活血汤对溃疡性结肠炎患者淋巴细胞功能的影响

董文毅, 胡刚正, 郑长青

■背景资料

中药治疗溃疡性结肠炎有效, 临床实验很多, 但从其对T细胞介导的免疫耐受的影响来研究作用机制的文献极少。

董文毅, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)中医科 辽宁省沈阳市 110004

胡刚正, 郑长青, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)消化内科 辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 董文毅, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院(盛京医院)中医科. Dong_wen_yi@tom.com

电话: 024-82680280 传真: 024-83956682

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-09

摘要

目的: 探讨补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对溃疡性结肠炎的治疗作用是否通过影响淋巴细胞的增殖或细胞因子表达谱来实现。

方法: 体外培养中用植物凝集素刺激溃疡性结肠炎患者外周血淋巴细胞, 分组加入一定剂量的补脾清肠活血汤、复合灌肠液、环孢素A及空白对照剂, 检测增殖程度及细胞因子表达谱。

结果: 复合灌肠液和环孢素A能显著抑制淋巴细胞的增殖及细胞因子IL-2、IL-4及IFN- γ 的分泌, 同时也抑制了免疫抑制性细胞因子IL-10的分泌, 而补脾清肠活血汤抑制增殖及促炎细胞因子的作用较弱, 但能促进IL-10的分泌。

结论: 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A均可通过影响T细胞来促进免疫耐受的形成, 但其作用的具体途径有差别, 这些途径很可能产生协同作用。

关键词: 溃疡性结肠炎; 中药; 淋巴细胞; 免疫耐受; IL-2; IFN- γ ; IL-10; IL-4

董文毅, 胡刚正, 郑长青. 补脾清肠活血汤对溃疡性结肠炎患者淋巴细胞功能的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1124-1127

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1124.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)在我国很常见, 且发病率有上升趋势, 而临床治疗常很棘手, 有效控制复发及诱导重度患者临床缓解还具

挑战性. 氨基水杨酸类及环孢素A等西药有一定的疗效, 但有长期应用副作用较大等不足. UC在我国很早就被认识, 中医药积累了丰富的治疗经验, 近几十年来, 国内也大量地报道了中西药结合治疗UC的临床实验, 疗效一般高于单纯西药, 而且副作用较小^[1-4]. 本科室根据中医理论及大量的临床实验结果, 自拟出补脾清肠活血汤口服剂及复合灌肠液(锡类散加三黄汤), 应用于临床10多年, 疗效比较满意, 尤其是联合西药诱导重度患者缓解和缓解期应用以预防复发。

补脾清肠活血汤及复合灌肠液临床疗效显著, 且副作用很小, 但在现代医学理论中的作用机制尚未深入研究. 近年来, 越来越多的研究者认为溃疡性结肠炎由肠道局部持续、过强的免疫反应所诱发, T淋巴细胞在此免疫反应的激发和维持中起中心作用^[5-8]. T淋巴细胞在正常人体肠道局部免疫耐受的形成中发挥关键作用, 而UC中这种耐受被打破^[9-10]. 已经很明确, T细胞的活化/增殖调控及主动免疫抑制(调节性T细胞的分化及其免疫抑制性细胞因子的产生)是免疫耐受形成的主要机制^[11-13]. 补脾清肠活血汤及复合灌肠液均为中药复方制剂, 药理作用很复杂, 推测其可能主要是通过诱导T细胞介导的免疫耐受的形成来发挥作用. 本研究在体外培养中用多克隆刺激剂活化人外周血淋巴细胞, 分组加入一定剂量的补脾清肠活血汤、复合灌肠液、环孢素A及空白对照剂, 检测增殖程度及细胞因子分泌谱后发现, 补脾清肠活血汤能诱导免疫抑制性细胞因子的产生, 复合灌肠液和环孢素A能抑制淋巴细胞的活化/增殖及促炎细胞因子的分泌。

1 材料和方法

1.1 材料 Lymphocyte-H购于Cedarlane, 胎牛血清及RPMI-1640购于Hyclone, Percoll购于Amersham, 中药均为无菌袋装免煎中药(10 g/袋), 锡类散为北京同仁堂产品(1 g/袋), 环孢素A由Sandoz生产, 植物凝集素购于Sigma, [³H]TdR购于中国原子能研究院, ELISA试剂盒购于

■研发前沿

炎症性肠病被认为是机体对自身的肠道菌群抗原刺激不能有效的形成免疫耐受所致, 调节性T细胞的分化及其免疫抑制性细胞因子的产生是近年来才认识到的免疫耐受形成的主要机制, 因此, 高效的筛选中药组方应该重点地研究其对调节性T细胞分化的影响。

eBioscience.

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞的分离 先后从10名溃疡性结肠炎患者(均为病程3 a以上的慢性复发型患者,符合2000年成都诊断标准)采外周血6 mL,立即注入肝素抗凝管,30 min内与4 mL含1 mmol/L EDTA的PBS混合,加入至15 mL离心管,用接6号加长针头的一次性注射器抽4 mL Lymphocyte-H,缓慢地铺在抗凝血下面,室温、2000 r/min离心20 min,取灰白层,用PBS洗两遍以去除血小板,加10 mL含100 mL/L胎牛血清、100 U/mL青霉素和链霉素、pH7.2的RPMI-1640(含L-Glutamine和HEPES)完全培养基混悬,抽4 mL 460 mL/L Percoll,缓慢地铺在细胞悬液下面,室温、2000 r/min离心20 min,留取下面1 mL内的细胞,洗两次,台盼蓝染色计数活细胞,取约 1×10^5 细胞离心涂片后Giemsa-white染色鉴定淋巴细胞的纯度,结果淋巴细胞的纯度和活性均大于95%.

1.2.2 药液的配制

1.2.2.1 补脾清肠活血汤 取党参、白术、茯苓、黄连、木香、白头翁、秦艽、枳实、当归、丹参、红花、赤芍、山楂各10 g,黄芪20 g,混合于已高温消毒的烧瓶中,加蒸馏/去离子水500 mL,置水浴箱中95℃ 30 min,反复震荡,取10 mL加于15 mL离心管中,15 000 g离心20 min,取上清液5 mL,PBS稀释4倍,一次性针头滤器过滤,作为10倍浓度的储藏液4℃保存备用.

1.2.2.2 复合灌肠液 取黄连、黄柏和黄芩各10 g,锡类散2袋,加蒸馏/去离子水150 mL,如上经加热、离心取上清、稀释和过滤,作为10倍浓度的储藏液4℃保存备用.

1.2.2.3 环孢素A 用PBS稀释环孢素A至5 mg/L,作为10倍浓度的储藏液4℃保存备用.

1.2.3 增殖及细胞因子检测 淋巴细胞以每孔 $1 \times 10^5/180 \mu\text{L}$ 加入96孔培养板,培养基为含100 mL/L胎牛血清、100 kU/L 青霉素和链霉素的RPMI-1640,用终浓度10 mg/L的植物凝集素作为多克隆刺激剂,分组分别加入20 μL 的补脾清肠活血汤、复合灌肠液和环孢素A储藏液及对照液PBS.在37℃,50 mL/L CO₂培养箱中培养48 h后,收集上清液储于-80℃用以检测细胞因子浓度,于增殖检测孔每孔加入0.5 UCi [³H]TdR,继续培养24 h后收集细胞于玻璃纤维滤纸上,蒸馏水冲洗,无水乙醇脱水、脱色,60℃烘干后置闪烁液中液闪计数.细胞因子IL-2、IFN- γ 、IL-4及IL-10的检

测用夹心法ELISA试剂盒,完全按照说明操作.

统计学处理 数据用Mean \pm SD表示,组间比较用配对样本的t检验,由SPSS 13.0统计软件完成.

2 结果

2.1 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对淋巴细胞增殖的影响 淋巴细胞经PHA刺激后增殖明显,但能被补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A抑制(对照组、补脾清肠活血汤、复合灌肠液和环孢素A组的液闪值分别为 4563 ± 674 、 4170 ± 500 、 2944 ± 361 和 2408 ± 498),补脾清肠活血汤的抑制作用最弱(平均抑制8.6%,与对照组比较 $P < 0.01$),复合灌肠液和环孢素A的抑制作用较强(分别平均抑制35.4%和47.2%,两组与对照组及补脾清肠活血汤组比较均 $P < 0.001$).

2.2 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对IL-2分泌的影响 淋巴细胞经PHA刺激后低分泌IL-2($36.3 \pm 16.2 \text{ ng/L}$),补脾清肠活血汤对其没有显著影响($31.5 \pm 17.8 \text{ ng/L}$, $P > 0.05$),复合灌肠液和环孢素A均能够显著抑制IL-2的分泌(分别为 $18.7 \pm 7.5 \text{ ng/L}$ 和 $18.4 \pm 9.4 \text{ ng/L}$,平均抑制48%和49%,与对照组比较均 $P < 0.01$).

2.3 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对IFN- γ 分泌的影响 淋巴细胞经PHA刺激后高分泌IFN- γ ($5900 \pm 2045 \text{ ng/L}$),补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A均能显著抑制其表达(分别为 $2832 \pm 1043 \text{ ng/L}$ 、 $3499 \pm 1948 \text{ ng/L}$ 和 $1763 \pm 780 \text{ ng/L}$,平均抑制52%、41%和70%,与对照组比较均 $P < 0.001$),补脾清肠活血汤和复合灌肠液的抑制作用无明显差异($P > 0.05$),环孢素A的抑制作用较强(与补脾清肠活血汤和复合灌肠液组比较均 $P < 0.01$).

2.4 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对IL-4分泌的影响 淋巴细胞经PHA刺激后低分泌IL-4($29.3 \pm 12.1 \text{ ng/L}$),补脾清肠活血汤组中略为增加($36.1 \pm 16.4 \text{ ng/L}$),但显著性达不到统计学意义($P > 0.05$),相反,复合灌肠液及环孢素A均能显著抑制IL-4的分泌(分别为 $17.1 \pm 6.9 \text{ ng/L}$ 和 $15.7 \pm 8.0 \text{ ng/L}$,平均抑制42%和46%,与对照组比较均 $P < 0.001$).

2.5 补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A对IL-10分泌的影响 淋巴细胞经PHA刺激后分泌IL-10($328 \pm 147 \text{ ng/L}$),补脾清肠活血汤能够显著促进其分泌($560 \pm 211 \text{ ng/L}$,平均增加70%,

■创新盘点

本文首次在体外培养中观察中药组方是否影响调节性T细胞的形成.

■应用要点

中药组方补脾清肠活血汤最适用于配合复合灌肠液,或联合西药(氨基水杨酸类或环孢素A)诱导重度溃疡性结肠炎缓解和缓解期应用以预防复发。

与对照组比较 $P<0.001$),相反,复合灌肠液和环孢素A均能显著抑制IL-10的分泌(分别为 253 ± 146 ng/L和 188 ± 96 ng/L,平均抑制23%和42%,与对照组比较分别为 $P<0.01$ 及 $P<0.001$)。

3 讨论

中药补脾清肠活血汤和复合灌肠液缓解期预防复发或联合西药诱导重症溃疡性结肠炎缓解有较好疗效,但其作用机制尚不清楚。环孢素A是强效免疫抑制剂,近年来用于重症UC急性期的治疗,对氨基水杨酸类及类固醇激素无效的患者仍有较高的诱导缓解率,是UC药物治疗上的重要进展之一^[14-15]。T淋巴细胞在UC免疫致病机制中的中心作用越来越受重视,其对抗原刺激的活化增殖程度及细胞因子表达谱能灵敏地反映功能状态,增殖越强提示免疫应答能力越强,细胞因子IL-2、IFN- γ 、IL-4及IL-10均主要由T细胞分泌,IL-2能促进淋巴细胞的增殖,具有较广泛的免疫调节作用,IFN- γ 主要由Th1细胞表达,主要参与细胞免疫,IL-4主要由Th2细胞表达,主要参与体液免疫,IL-10是重要的免疫抑制性细胞因子,Tr1细胞是近年来鉴定的重要调节性T细胞之一,以高表达IL-10为标记^[5,16-18]。

本实验想阐述中药补脾清肠活血汤、复合灌肠液及西药环孢素A治疗溃疡性结肠炎的药理作用是否是干预了淋巴细胞的功能,以及他们干预方式的差别。结果,复合灌肠液和环孢素A能显著抑制淋巴细胞的增殖,抑制IL-2及作为Th1和Th2标志的促炎细胞因子IFN- γ 和IL-4的分泌,同时也能抑制免疫抑制性细胞因子IL-10的分泌,环孢素A对细胞增殖及IFN- γ 的抑制作用较灌肠液强。这提示复合灌肠液和环孢素A的治疗作用是通过全面抑制T细胞对抗原的免疫应答来发挥的,而对T细胞的分化方向并无明显影响。补脾清肠活血汤对淋巴细胞的增殖及作为Th1标志的促炎细胞因子IFN- γ 有较弱的抑制作用,对IL-2及作为Th2标志的IL-4的分泌无显著影响,值得注意的是,其能促进作为Tr1细胞标志的IL-10的分泌。这说明补脾清肠活血汤能够影响T细胞的分化方向,阻止Th1细胞的分化,促进Tr1细胞的分化。近年来,炎症性肠病的发病机制被认为是机体的T细胞对自身肠道内部分菌群抗原的刺激产生过强的免疫反应,而不能形成免疫耐受,这种免疫失耐受很可能与T细胞的分化控制失调有关,其中主要是致病性T细胞/调节性T细胞的平衡失调^[7-10,19]。调节性T细胞的分化

为机体形成免疫耐受的重要机制,是近几年来免疫学领域研究的重大理论成果之一^[11-12,20],最近的研究证实炎症性肠病患者体内确实存在调节性T细胞的生成障碍^[21],这预示着通过促进调节性T细胞分化来治疗炎症性肠病将会成为主流研究方向。补脾清肠活血汤能促进体外培养的淋巴细胞向Tr1细胞分化,提示其对UC的体内治疗作用很可能是通过诱导调节性T细胞的生成来实现。因此,作者认为补脾清肠活血汤、复合灌肠液及环孢素A均可通过影响T细胞来促进免疫耐受的形成,而其作用的具体途径又有些差别,这些途径很可能产生协同作用,这也许是联合中西药疗效更好的理论基础。

4 参考文献

- 1 欧阳钦. 对加强炎症性肠病临床研究的意见. 中华消化杂志 2001; 21: 197-198
- 2 吴凤海. 中医药治疗溃疡性结肠的进展. 中华实用中西医杂志 2002; 2: 67-69
- 3 田海河, 董建华, 田德录, 赵凤志. 中药治疗溃疡性结肠炎的临床及实验研究. 北京中医药大学学报 1995; 18: 47-50
- 4 董宇翔, 李晓春, 张二力. 中药肠炎康口服液治疗溃疡性结肠炎临床疗效观察. 吉林大学学报(医学版) 2004; 30: 785-786
- 5 郑长青, 胡刚正. CD4⁺T淋巴细胞亚群的新认识及对炎症性肠病研究的指导. 世界华人消化杂志 2004; 12: 505-511
- 6 Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 2005; 307: 1920-1925
- 7 Rook GA, Brunet LR. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 2005; 54: 317-320
- 8 Powrie F. Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1029: 132-141
- 9 Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 448-455
- 10 Allez M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 666-676
- 11 Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 189-198
- 12 Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001; 2: 816-822
- 13 Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-337
- 14 Feagan BG. Maintenance therapy for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: S6-S17
- 15 Jani N, Regueiro MD. Medical therapy for ulcerative colitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 147-166
- 16 Schimpl A, Berberich I, Kneitz B, Kramer S, Santner-Nanan B, Wagner S, Wolf M, Hunig T. IL-2 and autoimmune disease. *Cytokine Growth Factor Rev*

- 2002; 13: 369-378
- 17 Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-573
- 18 Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 271-283
- 19 Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol Rev* 2005; 204: 184-194
- 20 Lohr J, Knoechel B, Nagabhushanam V, Abbas AK. T-cell tolerance and autoimmunity to systemic and tissue-restricted self-antigens. *Immunol Rev* 2005; 204: 116-127
- 21 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

■同行评价

本文研究内容较新, 临床意义较为重要。但是本研究所用的自制中药制剂不是临床所用的标准制剂, 因此需要考虑其差异对实验结论的可能影响。

电编 李琪 编辑 王瑾晖

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第十二届全国胆道外科学术会议征文通知

本刊讯 中华医学会外科学分会胆道外科学组拟定于2006-07在辽宁省沈阳市召开第12届全国胆道外科学术会议。此次会议由全国胆道外科学组委托中国医科大学附属第二医院(盛京医院)承办, 中国实用外科杂志社协办。大会将全面展示我国胆道外科近年来的新进展、新成果。届时将邀请国内外知名肝、胆外科专家作专题演讲。凡参会者均颁发国家级继续教育学分证书。现将征集论文的有关事宜通知如下:

1 征文内容

征文内容包括: (1)胆道外科学基础研究(胆道解剖与胆道疾病、胆石成因、胆道感染、胆道肿瘤、胆胰管结合部异常与胆道先天性疾病); (2)胆道外科的临床研究(胆囊、胆管结石、胆道肿瘤、意外性胆囊癌、胆道损伤、肝移植后胆道狭窄等); (3)胆道外科诊断与治疗的新技术、新方法(腹腔镜技术、内镜技术、介入技术、影像技术等); (4)胆道外科疾病的其他诊疗经验等。

2 征文要求

征文要求包括: (1)请寄论文全文及800字以内的摘要各一份, 4号字打印, 附电子稿件。无摘要者恕不受理。(2)论文要求科学性强、数据可靠、重点突出、文字精炼且未经发表者。论文须由作者所在单位审查盖章同意, 并请在信封正面注明会议征文字样。(3)截稿时间: 2006-05-08(当地邮戳为准)。稿件邮寄地址: 辽宁省沈阳市和平区三好街36号 中国医科大学附属第二医院 第一微创、胆道外科; 邮政编码: 110004。联系人: 吴硕东。投稿E-mail: wushudong@yahoo.com.cn。

世界华人消化杂志投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量,对所有来稿均进行同行评议,是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。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。2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 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。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综

述6 000字以内, 研究快报4 000字以内, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals). 见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

2.2 名词术语 应标准化, 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, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, 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。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或 T_2^1 , V_{max} 不能Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数 n , 均数mean, 标准差SD, F 检验, t 检验和概率 P , 相关系数 r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如 N , O , P , S , d , l)如 n -(normal, 正), N -(nitrogen, 氮), o -(ortho, 邻), O -(oxygen, 氧, 习惯不译), d -(dextro, 右旋), p -(para, 对), 例如 n -butyl acetate(醋酸正丁酯), N -methylacetanilide(N -甲基乙酰苯胺), o -cresol(邻甲酚), 3- O -methyl-adrenaline(3- O -甲基肾上腺素), d -amphetamine(右旋苯丙胺), l -dopa(左旋多巴), p -aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写 $in vitro$, $in vivo$, $in situ$; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如 m (质量), V (体积), F (力), p (压力), W (功), v (速度), Q (热量), E (电场强度), S (面积), t (时间), z (酶活性, kat), t (摄氏温度, °C), D (吸收剂量, Gy), A (放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), c (浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), w (质量分数, mg/g), b (质量摩尔浓度, mol/g), l (长度), b (宽度), h (高度), d (厚度), R (半径), D (直径), T_{max} , C_{max} , V_d , $T_{1/2}$ CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如 ras , $c-myc$; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标)或30 kDa; “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d, 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1

N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm \times 6 cm \times 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \cdot d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45 $\times 10^{-6}$; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1) t 检验用小写 t ; (2) F 检验用英文大写 F ; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写 r ; (5)自由度用希文小写 ν ; (6)样本数用英文小写 n ; (7)概率用英文斜体大写 P . 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 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 $P < 0.01$; 第三套为^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版). 收录的学术期刊. 世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱即辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

World Journal of Gastroenterology
自2005-01-01起为周刊发行, 每月7、14、21、28日出版。北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-261。WJG出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$ g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 3.6 ± 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm, 其SD/3=0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$, 百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 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。

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字左右, 最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 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。

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码。格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 男, 1966-02-26生, 河北省定县人, 汉族。1994年北京中医药大学硕士, 讲师。主要从事消化系统疾病的病理研究。

3.5 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如: 通讯作者: 马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 英文摘要

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。

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”。

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

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

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. wcyj@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致.格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象.应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度.研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征.如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准.如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨,高瑞丰,李炳庆,马连生,梅立新,吴玉珍,刘凤芹,廖振林.胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. *世界华人消化杂志* 2006;14:

3.9 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.正文内序号连排用(1), (2), (3).

0 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.

1 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.

2 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.

3 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 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 , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 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 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$,必须使用双面胶条黏贴在正文内,不能使用浆糊黏贴.

致谢 致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang et al”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注码号.

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行,每月8、18、28日出版.北京报刊发行局发行,邮发代号:82-262.《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版.免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95)225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方). 按顺序编号装订, 并考入磁盘内. 在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. 参考文献格式如下:

1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gastroenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]

2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863

3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450

4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 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)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (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, 所有来稿均需接受同行审阅.

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的. 投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名

单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员. 审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理. 录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬).

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改. 当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

4.5 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》、《中文生物医学期刊/会议文献数据库》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.

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献.

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>. 邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社.

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

世界华人消化杂志作者、读者、编委反馈信息

编者按 世界华人消化杂志自创刊已有14 a历史, 目前已经发展成为旬刊. 2006年本刊开辟了“海宁信箱”专栏, 旨在促使形成作者、读者、编者互动的局面, 适应我国消化病事业的飞速发展, 创办高质量的学术期刊, 进一步活跃学术界. 本专栏面向作者、读者、以及编委征集反馈信息, 希望借用大家的力量来引导杂志向更高的质量迈进. 反馈信息包括对杂志的总体评价、事实纠错、文字更正、解释说明, 编辑部会如实地将这些信息以公开或匿名的方式刊登在每期的固定位置. 反馈信息可以通过Email发送至h.n.zhang@wjgnet.com, 也可以发送手机短信至13146145159.

1 反馈信息

1.1 世界华人消化杂志办刊严谨, 服务理念强. 需要指出的是, 14卷1期, 109页文章《腹部外科脓毒症临床救治258例》中“死亡率”应为病死率. 死亡率指一定时期内(通常为1年)死亡人数与同期平均人口数之比, 说明该时期人口的死亡强度. 病死亡指一定时期内患某病的全部病人中因该病而死亡者的比例, 是衡量确诊疾病的死亡概率, 反映疾病严重度和医疗水平的. 110页左栏顺数第17行中“长达22 a的临床与实验研究, 在12 a间, ……”a是否为“年”; “22”为何后面又成了“12”? (四川大学华西医院中西医结合科唐文富)

1.2 世界华人消化杂志14卷1期基础研究栏目中, 有的文章与消化系疾病研究的国际前沿问题接轨(如骨髓间充质干细胞在胰腺生理更新和病理再生中的作用); 有的在分子水平研究胃癌发生

和幽门螺旋杆菌引起胃炎的分子机制, 有较大的参考价值. 慢性乙型肝炎患者血清脂质水平与病理分级的关系一文, 因为有肝活检材料作为金标准, 其价值远超过其他同类研究.

1.3 贵刊2005-07-28第13卷第14期《乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定》一文有一点疑问. 文中提到, 分别采用Aleljung和Maurilia的方法, 抽提到了罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)JCM1081的表面蛋白, 并通过Western blot试验, 得出结论, M_r 为29 000和14 000的两种表面蛋白为黏附相关蛋白. 注意到作者在抽提过程中加入了溶菌酶, 经查, 溶菌酶的 M_r 也为14 000左右(几个版本说法不同, 很难有确切数字). 在此, 提出疑问, 这个得到的 M_r 为14 000的表面蛋白会不会就是抽提时加入的溶菌酶? 作者经过离心, 透析, 但是有可能会残余. 而且通观全文, 作者也没有提到做过对照试验来消除溶菌酶残留的影响. 一点疑问, 望有机会与作者探讨! (上海水产大学食品学院04级 周方方)

编辑回应

首先, 对所有关注和支持本刊的读者、作者、以及编委表示衷心感谢, 对他们的批评我们一定虚心接受. 经核查, 除“年(a)”是本刊统一用法外, 其余属实. 在此我们对广大读者和作者表示郑重道歉. 我们保证在以后的工作中一定加强监督、规范工作流程, 尽最大努力避免此类错误的再次发生. 其次, 有了这些高度敬业、严肃对待学术的读者、作者、以及编委, 我们有信心将本刊进一步推向更高的发展领域.

2006年, 《世界华人消化杂志》在线办公系统将正式开通, 从投稿到出版所有环节一律在网上实现, 将会大大缩短从投稿到出版的时间. 世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号 电话: 010-85381901 <http://www.wjgnet.com/wcjd/index.jsp>.

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 主治医师
中山大学附属第一医院消化内科

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院

陈立波 副教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院外科

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院

陈耀凯 教授
第三军医大学西南医院感染病科

成军 教授
北京地坛医院传染病研究所

程英升 副教授
上海交通大学附属第六人民医院

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院普外科

邓长生 教授
武汉大学中南医院消化内科

樊红 副教授
东南大学医学院发育与疾病相关基因教育部重点实验室

高春芳 研究员
第二军医大学附属长征医院实验诊断科

关玉盘 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

黄志勇 副教授
华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心

江学良 副教授
济南军区总医院消化科

李国威 教授
西安交通大学第二医院

李永哲 副教授
北京市东城区帅府园1号北京协和医院检验科

李兆申 教授
上海第二军医大学附属长海医院消化内科

马大烈 教授
上海市长海医院病理科

卿三华 教授
南方医科大学南方医院普通外科

沈薇 教授
重庆医科大学附属第二医院

孙诚谊 教授
贵阳医学院附属医院

田素礼 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院

王春友 教授
华中科技大学同济医学院附属协和医院

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

许玲 副教授
第二军医大学长征医院中医科

许文燮 教授
上海交通大学生命科学与技术学院

姚登福 教授
南通大学附属医院

叶胜龙 教授
上海复旦大学中山医院肝癌研究所

张柏和 教授
第三军医大学西南医院感染病科

张绪清 副教授
哈医大附属第二医院胃肠乳腺外科

赵平 副教授
第二军医大学微生物学教研室

郑鹏远 教授
郑州大学第二附属医院消化科