

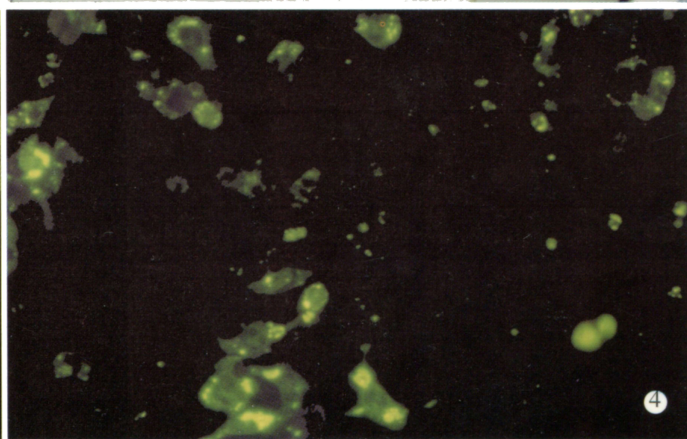
世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 4 月 15 日 第 11 卷 第 4 期

(Volume 11 Number 4)



4/2003

ISSN 1009-3079

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生



World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®, Clinical Medicine, Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

目次

2003 年 4 月 15 日 第 11 卷 第 4 期 (总第 108 期)

述评	373 新基因结构与功能研究的策略 成军
病毒性肝炎	378 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因和蛋白的生物信息学分析 成军,李克,陆荫英,王琳,刘妍 385 酵母双杂交技术筛选 Hcbp6 结合的肝细胞蛋白编码基因 王琳,李克,成军,陆荫英,张健,陈天艳,洪源,刘妍,王刚,钟彦伟 389 噬菌体表面展示技术筛选 HCBP6 人源单链可变区抗体 钟彦伟,成军,张忠东,孙敏,李强,李克,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅 394 丙型肝炎病毒核心蛋白结合蛋白 6 基因转染肝癌细胞的基因表达谱芯片分析 刘妍,成军,李克,杨倩,陆荫英,王琳,王建军 399 应用抑制性消减杂交技术克隆丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 反式激活的相关基因 牟劲松,刘妍,王刚,成军,段惠娟,李克,陆荫英,王琳,王惠芬
肝癌	404 单克隆抗体 3A5- 复方中药安迪偶联物的肝癌导向治疗 梁军,孙纪元,谢艳华,栗燕,闫露,王四旺 408 树突状细胞内外对肝癌细胞的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英,吕同德 411 肝癌组织中 survivin 蛋白表达的意义 陈涛,贾玉容,田伏洲,蔡忠红,李广阔 415 热休克蛋白 70 与 IL-2 对小鼠肝癌移植模型的治疗比较 傅庆国,沈晓东,孟凡东,郭仁宣 419 肝癌 DC 疫苗活化的 CTL 对人肝癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用 郭建巍,秦力维,蔡美英
基础研究	422 HBeAg 肝细胞结合蛋白基因的筛选与克隆 陆荫英,王琳,李克,刘妍,成军,张玲霞 426 酵母双杂交技术筛选 HBeAg 肝细胞结合蛋白基因 陆荫英,王琳,成军,李克,刘妍,张玲霞 430 大鼠肝卵圆细胞的生物学特征 陈耀凯,王宇明,李俊刚,郎松 434 肝硬变大鼠肝部分切除术后残肝 TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s mRNA 的变化 陈平,李昆,董家鸿,韩本立 438 细菌内同源重组法构建 HBV S 区和 C 区基因非复制型腺病毒载体及其体外表达 黄呈辉,欧阳玲,马会慧,汤正好,李刚,姚集鲁 442 大鼠肠巨噬细胞 TNF α 表达及复方大承气汤的影响 陈海龙,王辉,李文利,范琦 446 家兔回肠淋巴管铸型的扫描电镜研究 滕诚毅,王晓平,魏双艳,王广友,汤凤彩
焦点论坛	450 酵母单杂交技术的原理及应用 马守东,洪源,成军 451 酵母双杂交系统的原理及应用 陈天艳,成军,张树林 456 抑制性消减杂交技术原理及应用 杨倩,成军,刘妍,王建军,张树林 459 噬菌体展示技术的原理及应用 张忠东,成军,张树林 461 基因芯片技术在肝炎病毒研究中的应用 刘妍,成军,王建军,杨倩,陆荫英 464 丙型肝炎病毒与 JAK-STAT 信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳 466 丙型肝炎病毒与 MAPK 信号转导系统 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳 469 肿瘤抑制因子 p21/waf1 与肝炎病毒复制与表达的调节研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳 472 乙型肝炎病毒对细胞信号转导的影响 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳 474 生物信息学技术与新基因的研究 成军,刘妍,陆荫英,李克,王琳
研究快报	478 中药复方肠安泰对肠癌肺转移模型小鼠肠黏膜固有层 B 细胞及 IL-12 的影响 王文萍,王垂杰,姜良铎,饭乡正明 481 细胞外信号调节激酶在胃癌组织中的表达及其与幽门螺杆菌感染的关系 褚传莲,李延青,张燕,李文婕,赵宪邨

研究快报	483 实验性肝纤维化形成过程中几种基质金属蛋白酶表达的研究 李保森,游绍莉,赵志海,辛绍杰,赵景民,王松山 486 鼠肝移植对胃黏膜损伤的实验研究 褚延魁,马庆久,鲁建国,刘维,何显力,杜锡林,乔庆,王胜智
临床经验	488 重叠丙型肝炎病毒感染在慢性乙型肝炎患者肝脏病变中的作用 商庆华,于建国,徐传镇,肖德明,尹燕明,陈崇兴,张光曙 491 正常人胃左静脉的声象图及血流动力学特征 夏建国,董胜翔,李凤华 494 手术与非手术治疗重症急性胰腺炎 120 例 金世龙,侯庆福,顾红光,王仁云,廖维健
消息	388 欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志 393 欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology® 398 中国科技期刊走向世界的步伐正在加快 403 世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次 407 提供您使用世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版 414 世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册 418 美国国立医学图书馆 2002 年度收录中国医学期刊名单 425 世界胃肠病学杂志英文版获得 2003-2004 年国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 433 WJG 搭建我国消化化学基础和临床研究惟一国际交流的平台 437 世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊 477 世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊
征文通知	429 第五届上海国际肝癌肝炎会议征文启事 480 全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会征文通知
电子版	2003 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm 2002 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm 2001 世界华人消化杂志电子版 http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm 2003 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm 2002 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm 2001 World J Gastroenterol 电子版 http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm
读者来信	493
封面故事	377 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所、基因治疗研究中心

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
(月刊)
创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-04-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀 张金哲
黄象谦 张学庸
黄志强 赵东海
黎介寿 周殿元
刘耕陶 社长总编辑 马连生
裘法祖 中文编辑 潘伯荣
汤钊猷 王瑾晖
王宝恩 英文编辑 任师颜
危北海 排版 李少华
吴孟超 校对 李天华
吴咸中

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail: wcjd@wjgnet.com
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)85381892
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 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)85381892
传真: (010)85381893
2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录
美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志()》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
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)》
中国生物医学期刊目次数据库
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)

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.

ISSN 1009-3079 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证
CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期 24.00 元 全年 288.00 元 1401004000050

COMMENTARY

Strategy in study the structure and function of novel gene

Cheng J 373

VIRAL HEPATITIS

Bioinformatics analysis of human hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene and protein

Cheng J, Li K, Lu YY, Wang L, Liu Y 378

Screening of gene encoding of hepatic proteins interacting with Hcbp6 via yeast two hybridization

Wang L, Li K, Cheng J, Lu YY, Zhang J, Chen TY, Hong Y, Liu Y, Wang G, Zhong YW 385

Screen for human single chain variable region in antibody against human hepatitis C virus core protein binding protein 6

Zhong YW, Cheng J, Zhang ZD, Sun M, Li Q, Li K, Wang L, Li L, Zhang LX, Chen JM 389

Gene expression profile of HepG2 cell transfected with hepatitis C virus core protein-binding protein 6 gene

Liu Y, Cheng J, Li K, Yang Q, Lu YY, Wang L, Wang JJ 394

Cloning of genes transactivated by NS3 protein of HCV with suppressive and subtractive hybridization

Mu JS, Liu Y, Wang G, Cheng J, Duan HJ, Li K, Lu YY, Wang L, Wang HF 399

LIVER CANCER

Effect of monoclonal antibody 3A5 coupled with Chinese medicine compound Andi in targeted treatment of hepatocellular carcinoma

Liang J, Sun JY, Xie YH, Li Y, Yan L, Wang SW 404

Inhibition of dendritic cells against hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*

Guo JW, Qin LW, Cai MY, Lu TD 408

Expression of survivin protein in hepatocellular carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features and prognosis.

Chen T, Jia YR, Tian FZ, Cai ZH, Li GK 411

Comparison of therapeutic efficacy between tumor-derived heat shock protein 70 and interleukine-2

Fu QG, Shen XD, Meng FD, Guo RX 415

Cytotoxic lymphocytes primed by DC based hepatocellular carcinoma vaccine against growth of carcinoma xenograft on nude mice

Guo JW, Qin LW, Cai MY 419

BASIC RESEARCH

Screening and cloning of gene encoding HBcAg interacting protein in hepatocytes

Lu YY, Wang L, Li K, Cheng J, Liu Y, Zhang LX 422

Screening of HBcAg interacting proteins in hepatocytes with yeast-two hybrid technique

Lu YY, Wang L, Li K, Liu Y, Cheng J, Zhang LX 426

Biological characteristics of rat hepatic oval cells

Chen YK, Wang YM, Li JG, Lang S 430

Changes of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA after partial hepatectomy in rat liver

Chen P, Li K, Dong JH, Han BL 434

Construction of replication-deficient recombinant adenoviral vector carrying HBV S and C region gene by homologous recombination in bacteria and its expression *in vitro*

Huang CH, Ou-Yang L, Ma HH, Tang ZH, Li G, Yao JL 438

TNF α expression and effects of Dachengqi Decoction compound in gut macrophages

Chen HL, Wang H, Li WL, Fan Q 442

Lymphatic corrosion casts in rabbit ileum: scanning electronmicroscopic studies

Teng CY, Wang XP, Wei SY, Wang GY, Tang FC 446

FOCUSED FORUM

Principle and applications of yeast single hybridization

Ma SD, Hong Y, Cheng J 450

Principle of yeast two hybridization and its applications

Chen TY, Cheng J, Zhang SL 451

Principle and applications of suppressive and subtractive hybridization technique

Yang Q, Cheng J, Liu Y, Wang JJ, Wang SL 456

Principle of phage display technique and its application

Zhang ZD, Cheng J, Zhong YW, Zhang SL 459

Gene chip technique in the pathogenesis of viral hepatitis

Liu Y, Cheng J, Wang JJ, Yang Q, Lu YY 461

Hepatitis C virus and signal transduction system of JAK-STAT

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 464

Hepatitis C virus and signal transduction system of MAPK

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 466

Tumor inhibitive factor p21/waf1 and regulation of replication and expression of hepatitis virus

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 469

Effect of Hepatitis B virus on cellular signal transduction

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 472

Study on Bioinformatics and new gene

Cheng J, Liu Y, Lu YY, Li K, Wang L 474

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi \$

World Chinese Journal of Digestology
Monthly \$ \$

Founded on 15th January, 1993

Renamed on 25th January, 1998

Publication date 15th April, 2003

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/R

Edited by Editorial Board of World Chinese Journal of Digestology
P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

77, Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Overseas Distributor China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China **Code No.** M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

Copyright © 2003 by The WJG Press

Indexed/

Abstracted by

Chemical Abstracts

EMBASE/

Excerpta Medica

Abstract Journal

大鼠肠巨噬细胞 $\text{TNF}\alpha$ 表达及复方大承气汤的影响

陈海龙,王 辉,李文利,范 琦

陈海龙,王辉,大连医科大学附属第一医院 辽宁省大连市 116011
李文利,范琦,辽宁省农科院大连生物技术研究所以 辽宁省大连市 116011
陈海龙,男,1962-08-30生,吉林省农安人,汉族.1987年白求恩医科大学本科毕业,1990年大连医科大学硕士毕业,1996年天津医科大学博士毕业,教授,博士生导师,享受国务院特殊津贴,主要从事胆胰疾病的中西医结合诊治研究,发表论著50篇.
国家自然科学基金资助课题, No.39700194
项目负责人:陈海龙,116011,辽宁省大连市中山路222号,大连医科大学附属第一医院. hailong_chen@x263.net
电话:0411-3635963-3003 传真:0411-3622844
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-11-13

$\text{TNF}\alpha$ expression and effects of Dachengqi Decoction in compound in gut macrophages

Hai-Long Chen, Hui Wang, Wen-Li Li, Qi Fan

Hai-Long Chen, Hui Wang, Wen-Li Li, Qi Fan, The First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39700194
Correspondence to: Dr. Hai-Long Chen, First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province China.
hailong_chen@x263.net
Received: 2002-11-06 Accepted: 2002-11-13

Abstract

AIM: To explore the rule of producing $\text{TNF}\alpha$ in gut macrophages through respects of gene expression and protein synthesis of $\text{TNF}\alpha$ and to observe the effect of dexamethasone (DEX), monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF}\alpha$ moAb) and Fufang Dachengqi Decoction compound on $\text{TNF}\alpha$ production.

METHODS: The cultured rat gut macrophages were divided into five groups: control group (group C), lipopolysaccharide (LPS) group (group L), DEX treated group (group L+D), $\text{TNF}\alpha$ -MoAb treated group (group L+M), LPS plus Fufang Da Chengqi Decoction treated group (group L+F). Each group was divided into four phases: cultured for 3, 6, 12, and 24 h. The supernatants were collected and frozen at -70°C until $\text{TNF}\alpha$ was determined, and the cells were used to isolate the RNA. $\text{TNF}\alpha$ levels were determined by radioimmunoassay method. The expression of $\text{TNF}\alpha$ mRNA was evaluated by RT-PCR.

RESULTS: The level of $\text{TNF}\alpha$ and expression of $\text{TNF}\alpha$ mRNA significantly increased at each phase in group L. The level of $\text{TNF}\alpha$ significantly decreased at each phase in group L+D, group L+M and group L+F compared with group L. The expression of $\text{TNF}\alpha$ mRNA in each treatment group had no obvious difference, compared with group L in 3 h, but group L+D and group L+F significantly decreased in 6, 12, and 24 h. Group L+M still showed no obvious difference.

CONCLUSION: Gut macrophage induced by LPS can produce more $\text{TNF}\alpha$ through its gene expression and protein synthesis.

DEX, Fufang Dachengqi Decoction can suppress the $\text{TNF}\alpha$ mRNA transcription and protein synthesis of $\text{TNF}\alpha$; $\text{TNF}\alpha$ -moAb only lowered the level of $\text{TNF}\alpha$ protein. The three drugs have protective effects in inflammatory mediators reaction, gut barrier damage and multiple organ dysfunction syndrome (MODS).

Chen HL, Wang H, Li WL, Fan Q. $\text{TNF}\alpha$ expression and effects of Dachengqi Decoction in compound in gut macrophages. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(4):442-445

摘要

目的:探讨体外培养的肠巨噬细胞分泌 $\text{TNF}\alpha$ 的规律及地塞米松、 $\text{TNF}\alpha$ 单克隆抗体及复方大承气汤对LPS诱导的肠巨噬细胞 $\text{TNF}\alpha$ 产生的影响。

方法:体外分离培养大鼠肠巨噬细胞。设对照组、脂多糖组、地塞米松处理组、 $\text{TNF}\alpha$ 单抗处理组和复方大承气汤处理组。每组分别在3 h, 6 h, 12 h和24 h取上清液,用放免法检测 $\text{TNF}\alpha$ 浓度。并分别收集肠巨噬细胞,提取RNA,采用RT-PCR法相对定量 $\text{TNF}\alpha$ mRNA。

结果:肠巨噬细胞经脂多糖(LPS)诱导后,各时相 $\text{TNF}\alpha$ 分泌及 $\text{TNF}\alpha$ mRNA表达均明显增加;地塞米松、 $\text{TNF}\alpha$ 单克隆抗体及复方大承气汤处理后,各时相 $\text{TNF}\alpha$ 分泌都较脂多糖(LPS)诱导组显著下降,各处理组 $\text{TNF}\alpha$ mRNA表达在3 h时与脂多糖(LPS)诱导组比较无明显差异,6 h、12 h、24 h,地塞米松、复方大承气汤处理组显著降低,而 $\text{TNF}\alpha$ 单克隆抗体处理组无明显差异。

结论:LPS是肠巨噬细胞分泌 $\text{TNF}\alpha$ 的有效激活剂,地塞米松、复方大承气汤能从蛋白质及核酸水平抑制 $\text{TNF}\alpha$ 的产生,而 $\text{TNF}\alpha$ 单克隆抗体只能从蛋白质水平抑制 $\text{TNF}\alpha$ 的产生。

陈海龙,王辉,李文利,范琦. 大鼠肠巨噬细胞 $\text{TNF}\alpha$ 表达及复方大承气汤的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(4):442-445

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/442.htm>

0 引言

在严重感染(急性胰腺炎、急性胆道感染、外科腹内感染等)和创伤(烧伤等)应激状态下,肠道屏障常受到损害,产生肠源性感染和内毒素血症,引起机体严重的全身反应和病理损害,导致MODS而死亡^[1-9]。单核巨噬细胞系统(包括腹腔巨噬细胞、肝脏Kupffer细胞、肺巨噬细胞等)分泌的肿瘤坏死因子($\text{TNF}\alpha$)是机体

炎症反应的主要致病因子. 炎症反应的正确调控成为目前研究的热点. 肠巨噬细胞是其中一部分, 也是肠道屏障的重要功能细胞. 但是单独分离出来的肠巨噬细胞分泌 TNF α 的规律的研究尚未见报道. 我们通过体外分离和培养大鼠肠巨噬细胞, 研究其分泌 TNF α 的规律, 特别是在脂多糖刺激下 TNF α mRNA 表达及地塞米松、TNF α 单克隆抗体特别是通里攻下中药复方大承气汤对 LPS 诱导的肠巨噬细胞 TNF α 分泌及 TNF α mRNA 表达产生的影响, 以进一步明确肠道巨噬细胞在肠道屏障功能中的地位, 在机体全身和肠道局部炎症反应中的作用, 为临床上正确调控炎症反应, 保护肠道屏障提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 SD 健康大鼠, 质量 220-250 g, 由大连医科大学实验动物中心提供; RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司; 等渗细胞分离液(Percoll solution, 由 1 份 10 \times Dulbecco's 磷酸盐缓冲生理盐水和 9 份细胞分离液构成. 不同浓度的 Percoll 溶液用 1 \times Dulbecco's 磷酸盐缓冲生理盐水稀释; 胶原酶 IV 及脂多糖(购自 Sigma 公司); RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒(大连宝生物公司); 大鼠 TNF α 放免检测试剂盒(解放军总医院科技开发中心放免所); 复方大承气汤: 由大黄、川朴、枳实、芒硝、连翘、栀子和牡丹皮等组成, 其中大黄后下, 芒硝冲用. 由大连医科大学中西医结合急腹症研究所制备, 以原液再经抽提、过滤制成精制药液, 含生药 1 kg/L.

1.2 方法 肠巨噬细胞分离和培养参照文献[10]. 大鼠以密闭 CO₂ 笼处死, 迅速取全肠. 用冷 PBS(pH=7.4)液冲洗肠腔, 纵向剖开, 置入含 1 g/L EDTA 的 Hanks 平衡盐溶液中, 37 $^{\circ}$ C 水浴振荡 60 min. 弃上清, 用 5 g/L 胶原酶 IV 消化 2 h. 所得细胞悬液以尼龙网过滤. 再以 Hanks 液洗涤, 重悬于 500 g/L 等渗细胞分离液, 离心, 2 000 r \cdot min⁻¹, 4 $^{\circ}$ C, 15 min. 收集沉淀, 得肠巨噬细胞, 以无钙、镁 Hanks 液洗涤 3 遍. 用胎蓝染色, 细胞活力约为 90 %. 计数巨噬细胞, 以 RPMI 1640 培养基调细胞浓度至 2 \times 10⁸/L. 加入 24 孔培养板, 每孔 1 mL, 置于 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养. 第 1 组: 对照组, 细胞上清液中加入培养基 0.05 mL. 第 2 组: 脂多糖诱导组, 加脂多糖(LPS, 终浓度 10 mg/L) 0.05 mL. 第 3 组: 地塞米松处理组, 加脂多糖(LPS, 终浓度 10 mg/L) 0.025 mL,

同时加入地塞米松(终浓度 10⁻⁶ mmol/L) 0.025 mL. 第 4 组: TNF α 单抗处理组, 加脂多糖(LPS, 终浓度 10 mg/L) 0.025 mL, 同时加入 TNF α 单抗(终浓度 10⁻¹ mmol/L) 0.025 mL. 第 5 组: 复方大承气汤处理组, 加脂多糖(LPS, 终浓度 10 mg/L) 0.025 mL, 同时加入复方大承气汤(终浓度 1:100) 0.025 mL. 每组分 4 个时相: 3 h, 6 h, 24 h, 每时相 6 个孔, 分别取上清液, -70 $^{\circ}$ C 保存, 用于检测 TNF α . 细胞用于提取 RNA, RT-PCR 法检测 TNF α mRNA. TNF α 检测用放免法.

TNF α mRNA 表达采用 RT-PCR 法. 细胞总 RNA 提取, 按试剂盒操作. 细胞总 RNA 稀释至 1 g/L. 取 1 μ g 用于合成 cDNA 单链. cDNA 单链的合成, 反应条件: 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 循环一次. 产物取 1 μ L 用于 PCR 反应. PCR 反应 TNF α 引物: P(T1) 5' - GGATCATCTTCTCAAACTCG-3' P(T2) 5' - TCACAGAGCAATGACTCCAAA - 3' 其扩增片段为 348 个碱基. β -肌动蛋白引物^[11] (β -actin 作为内参照, 用于 TNF α mRNA 相对定量): P(A1) 5' - TAAAGACCTCTATGCCAACAC - 3' P(A2) 5' - TAAAGCCATGCCAAA TGTCTC - 3' 其扩增片段为 348 个碱基. 扩增步骤: 变性温度 94 $^{\circ}$ C, 45 s, 退火温度 55 $^{\circ}$ C, 45 s, 延伸温度 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 循环 35 次后, 72 $^{\circ}$ C, 延伸 10 min. 产物取 10 μ L, 16 g/L 凝胶电泳. 紫外灯下照相, 胶片经密度扫描, 得 TNF α 带与 β -肌动蛋白(β -actin)带的密度比.

统计学处理 所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 结果以 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析, 以 $P < 0.05$ 为检验显著性标准.

2 结果

2.1 肠巨噬细胞上清液 TNF α 浓度 正常细胞(对照组)培养上清液中 TNF α 浓度较低, 经 LPS 刺激后, 各时相均明显增高($P < 0.01$), 3 h 增加明显, 6 h 达到高峰, 12 h 开始下降, 24 h 逐渐降低. 应用地塞米松、TNF α 单克隆抗体及复方大承气汤处理后, 各时相上清液 TNF α 浓度均较相应的脂多糖诱导组明显降低($P < 0.01$, 表 1).

2.2 肠巨噬细胞 TNF α mRNA 表达 正常细胞(对照组)无明显 TNF α mRNA 表达, 经 LPS 诱导后 TNF α mRNA 表达增加, 3 h 增加明显, 6 h 达到高峰, 12-24 h 逐渐降低. DEX 处理组、复方大承气汤处理组 TNF α

表 1 各组细胞上清液中 TNF α 浓度(μ g/ml, $\bar{x} \pm s$)

	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	0.095 \pm 0.011	0.093 \pm 0.007	0.091 \pm 0.009	0.055 \pm 0.016
LPS 诱导组	1.575 \pm 0.129 ^a	1.978 \pm 0.083 ^a	1.977 \pm 0.076 ^a	1.639 \pm 0.058 ^b
DEX 处理组	0.787 \pm 0.041 ^d	1.208 \pm 0.278 ^d	0.680 \pm 0.077 ^d	0.495 \pm 0.010 ^d
复方大承气汤处理组	0.996 \pm 0.123 ^d	1.326 \pm 0.096 ^d	0.879 \pm 0.080 ^d	0.774 \pm 0.069 ^d
TNF α 单抗处理组	0.619 \pm 0.034 ^d	1.132 \pm 0.108 ^d	0.592 \pm 0.045 ^d	0.531 \pm 0.023 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 对照组比较; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs LPS 诱导组比较.

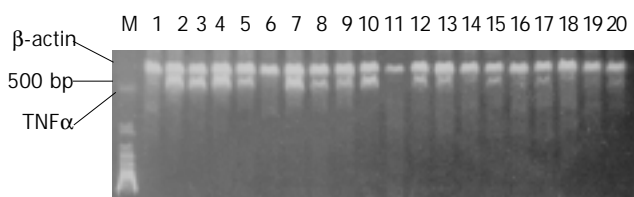
mRNA 表达与 LPS 诱导组比较, 3 h 皆无显著性差异 ($P > 0.05$), 6 h, 12 h, 24 h 则明显降低 ($P < 0.05-0.01$,

图 1, 表 2)。TNF α 单克隆抗体处理组与 LPS 诱导组比较, 各时相皆无明显差异。

表 2 各组肠巨噬细胞 TNF α mRNA 表达(TNF α /actin 积分光度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组	-	-	-	-
LPS 诱导组	0.676 \pm 0.005	0.905 \pm 0.015	0.367 \pm 0.004	0.117 \pm 0.017
DEX 处理组	0.667 \pm 0.010	0.350 \pm 0.052 ^b	0.228 \pm 0.015 ^b	0.018 \pm 0.006 ^a
复方大承气汤处理组	0.672 \pm 0.010	0.343 \pm 0.012 ^b	0.112 \pm 0.011 ^b	0.017 \pm 0.009 ^a
TNF α 单抗处理组	0.671 \pm 0.010	0.918 \pm 0.002	0.358 \pm 0.009	0.124 \pm 0.012

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 内毒素诱导组比较。



M:Marker; 1:3 h 的正常细胞(N₃); 2:3 h 的 LPS 诱导细胞(L₃); 3:3 h 的 DEX 处理细胞(D₃); 4:3 h 的复方大承气汤处理细胞(F₃); 5:3 h 的 TNF α Ab 处理细胞(M₃); 6:N₆; 7:L₆; 8:D₆; 9:F₆; 10:M₆; 11:N₁₂; 12:L₁₂; 13:D₁₂; 14:F₁₂; 15:M₁₂; 16:N₂₄; 17:L₂₄; 18:D₂₄; 19:F₂₄; 20:M₂₄
图 1 RT-PCR 检测各组肠巨噬细胞 TNF α mRNA。

3 讨论

肠巨噬细胞是肠道发挥屏障功能的重要组成部分, 同时他还是机体单核 - 巨噬细胞系统的成员之一, 也是肠产生 TNF α 的主要细胞^[12]。肠巨噬细胞受到内毒素等因素攻击可以释放大量的 TNF α , 除了通过内分泌形式进入血循环, 作用于肝、肺、肾等产生远隔器官损害外, 还可通过旁分泌形式对邻近肠上皮细胞发生作用, 从而影响肠道的屏障功能^[13-25]。因此, 研究肠巨噬细胞表达和分泌炎症递质的规律及中西药物影响具有重要意义。我们发现, 肠巨噬细胞在正常情况下有低量的 TNF α 分泌, 无明显基因表达。在 LPS(10 mg/L)作用下, TNF α 分泌及 TNF α mRNA 表达都明显增加, 3 h, 6 h 增加明显, 6 h 相对较高, 12 h, 24 h 逐渐降低, 但仍高于正常水平。表明肠道巨噬细胞在肠道屏障中具有双重作用。必须在不同时期进行正确调控, 才能发挥其保护作用, 减少或消除其损伤作用。目前较多应用地塞米松^[26-28]、TNF α 单克隆抗体^[29,30]及中药来阻断 TNF α 损伤作用^[28-34]。本实验探讨这三种不同中西药物对 LPS 诱导的肠巨噬细胞表达和分泌 TNF 的影响。地塞米松对 LPS 诱导的肠巨噬细胞 TNF α 分泌及基因表达具有明显的抑制作用。TNF α 单克隆抗体对 LPS 诱导的肠巨噬细胞 TNF α 蛋白质分泌有明显的抑制作用, 而对基因表达无抑制作用。

复方大承气汤可抑制 LPS 诱导的肠巨噬细胞 TNF α 的分泌及基因表达。复方大承气汤是由经典通里攻下名方大承气汤加减而成。由大连医科大学中西医结合急腹症研究所组方配制, 广泛应用于临床的常用方剂。主

要用于治疗急性肠梗阻、急性阑尾炎、急性胰腺炎、急性腹腔感染等疾病。有关实验表明, 此方有增强胃肠道推进运动作用, 增加肠血流量, 降低血管通透性, 以及抑菌抗感染, 减轻肠源性内毒素血症, 保护胃肠黏膜等作用^[31-34]。但此药对肠巨噬细胞及其分泌 TNF α 的影响, 还未见深入研究。本实验通过复方大承气汤直接作用于体外培养的肠巨噬细胞, 结果表明, 其可以较强抑制炎症递质 TNF α 的分泌和 mRNA 的表达。作用机制尚不完全清楚, 估计可能与下调核转录因子(NF-kappaB)及调节细胞内 cGMP 和 cAMP 的比例等有关。

总之, 这三种药物都可不同程度抑制 TNF α 介导的炎症反应, 但从作用环节和药理效应方面看, 地塞米松又是一个对机体免疫功能具有一定损害作用的免疫抑制药, 而且主要作用于基因转录阶段, 当炎症进展, 蛋白质已经大量表达时就显得无能为力。TNF α 单克隆抗体只是对已经表达的蛋白质具有中和作用, 对于炎症反应的初始步骤基因水平的阻抑则不起作用, 而且生产工艺复杂, 价格昂贵, 广泛应用于临床尚需时日。

中药药源广泛、价廉、易得。他的作用又是多方面多层次的, 不仅在基因转录、蛋白质表达水平, 还是在效应阶段都起作用。另外他在整体水平上可以通过扶正祛邪、改善微循环、增强内稳态, 直接中和、拮抗抑制细菌内毒素、保护肠道屏障功能和其他脏器功能等发挥作用。如果与地塞米松、TNF α 单克隆抗体等配合应用, 将是一种很好的中西医结合形式。必将优势互补、相得益彰, 为临床上保护肠屏障, 防治 MODS 提供有效方法。

4 参考文献

- Deitch EA. Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* 1992;216:117-134
- Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996;20:411-417
- Goris RJ. MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? *World J Surg* 1996;20:418-421
- Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002;8:962-965
- Zhao LF, Han DW. Clinical significance of endotoxemia in liver

- diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:391-393
- 6 Nolan JP, Camara DS. Intestinal endotoxins as co-factors in liver injury. *Immunol Invest* 1989;18:325-337
- 7 Pugin J, Chevreton JC. The intestine-liver-lung axis in septic syndrome. *Schweiz Med Wochenschr* 1991;121:1538-1544
- 8 Towfigh S, Heisler T, Rigberg DA, Hines OJ, Chu J, McFadden DW, Chandler C. Intestinal ischemia and the gut-liver axis: an in vitro model. *J Surg Res* 2000;88:160-164
- 9 Koo DJ, Zhou M, Jackman D, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH, Wang P. Is gut the major source of proinflammatory cytokine release during polymicrobial sepsis? *Biochim Biophys Acta* 1999;1454:289-295
- 10 Ogle CK, Mao JX, Wu JZ, Ogle JD, Alexander JW. The 1994 lindberg award. The production of tumor necrosis factor, interleukin-1, interleukin-6, and prostaglandin E2 by isolated enterocytes and gut macrophages: effect of lipopolysaccharide and thermal injury. *J Burn Rehabil* 1994;15: 470-477
- 11 Nedel U, Zakut R, Shani M, Levy Z, Yaffe D, Neuman S. The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic β -actin gene. *Nucleic Acid Res* 1983;11:1759-1771
- 12 Yuan J, Xiao G, Zhou L. A study of the expression and localization of tumor necrosis factor mRNA in small intestine of rats after severe burn. *Zhonghua Zhengxing Shaoshang Waikexue* 1996;12:163-166
- 13 Nathens AB, Rotstein OD, Dackiw AP, Marshall JC. Intestinal epithelial cells down-regulate macrophage tumor necrosis factor- α secretion: a mechanism for immune homeostasis in the gut-associated lymphoid tissue. *Surgery* 1995;118:343-350
- 14 Nilsen EM, Johansen FE, Jahnsen FL, Lundin KE, Scholz T, Brandtzaeg P, Haraldsen G. Cytokine profiles of cultured microvascular endothelial cells from the human intestine. *Gut* 1998;42:635-642
- 15 Tan X, Hsueh W, Gonzalez-Crussi F. Cellular localization of tumor necrosis factor (TNF)- α transcripts in normal bowel and in necrotizing enterocolitis. TNF gene expression by Paneth cells in intestinal eosinophils, and macrophages. *Am J Pathol* 1993;142:1858-1865
- 16 Kwon JH, Keates S, Bassani L, Mayer LF, Keates AC. Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3 α (MIP-3 α) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;51:818-826
- 17 Cong B, Li SJ, Yao YX, Zhu GJ, Ling YL. Effect of cholecystokinin octapeptide on tumor necrosis factor α transcription and nuclear factor- κ B activity induced by lipopolysaccharide in rat pulmonary interstitial macrophages. *World J Gastroenterol* 2002;8:718-723
- 18 Fujie S, Hieshima K, Izawa D, Nakayama T, Fujisawa R, Ohyanagi H, Yoshie O. Proinflammatory cytokines induce liver and activate regulated chemokine/macrophage inflammatory protein 3 α /CCL20 in mucosal epithelial cells through NF- κ B [correction of NK-KappaB]. *Int Immunol* 2002;13:1255-1263
- 19 O'Keefe J, Lynch S, Whelan A, Jackson J, Kennedy NP, Feighery C. Flow cytometric measurement of intracellular migration inhibition factor and tumor necrosis factor α in the mucosa of patients with coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2001;125:376-382
- 20 Koksoy C, Kuzu MA, Kuzui-Ergun H, Gurhan I. Role of tumor necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 2001;88:464-468
- 21 Zareir M, Singh PK, Irvine EJ, Sherman PM, McKay DM. Monocyte/macrophage activation by normal bacteria and bacterial products: implications for altered epithelial function in Crohn's disease. *Am J Pathol* 2001;158:1101-1109
- 22 Woywodt A, Ludwig D, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Jantschek G, Kirchner H, Stange EF. Mucosal cytokine expression, cellular markers and adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:267-276
- 23 Sun Z, Olanders K, Lason A, Dib M, Annborn M, Andersson K, Wang X, Andersson R. Effective treatment of gut barrier dysfunction using an antioxidant, a PAF inhibitor, and monoclonal antibodies against the adhesion molecule PECAM-1. *J Surg Res* 2002;105:220-233
- 24 Forsythe RM, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Lipopolysaccharide-induced enterocyte-derived nitric oxide induces intestinal monolayer permeability in an autocrine fashion. *Shock* 2002;17:180-184
- 25 Gong JP, Wu CX, Liu CA, Li SW, Shi YJ, Yang K, Li Y, Li XH. Intestinal damage mediated by kupffer cells in rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol* 2002;8:923-927
- 26 Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luede C, Cerami A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986;232:977-982
- 27 Beutler B, Cerami A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 1987;316:379-384
- 28 Giroir BP. Mediators of septic shock: new approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. *Crit Care Med* 1993;21:780-789
- 29 Wanner GA, Muller PE, Ertel W, Bauer M, Menger MD, Messmer K. Differential effect of anti-TNF- α antibody on proinflammatory cytokine release by Kupffer cells following liver ischemia and reperfusion. *Shock* 1999;11:391-395
- 30 Yao YM. Protective effect of monoclonal antibody of tumor necrosis factor- α for vital organ in a model suffering from intestinal ischemia and reperfusion injury. *Zhonghua Waikexue* 1993;31:497-500
- 31 Chen HL. Exploration on essence of yang-ming fu-shi syndrome from viewpoint of traditional Chinese medicine combined with Western medicine. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1993;13:690-691
- 32 Chen HL, Wu XZ, Gan FL. Protective effects of tongli gongxia herbs on gut barrier in rat with multiple organ dysfunction syndrome. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2000;20:120-122
- 33 Wu XZ. Traditional Chinese therapy of acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:417-418
- 34 Yue MX. Combined treatment of abdominal diseases with MODS by Chinese medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:937-941



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

