

空肠弯曲菌 28-31 ku 外膜蛋白的免疫原性

冯胜军, 孙万邦, 姚新生, 肖政

冯胜军, 孙万邦, 姚新生, 肖政, 遵义医学院免疫学教研室
贵州省遵义市 563003
冯胜军, 男, 1976-01-03 生, 贵州省德江人, 2003 年遵义医学院硕士研究生毕业, 助教, 主要从事抗感染免疫及疫苗研究。
贵州省社会发展基金重点课题, No. C-168
贵州省优秀人才省长基金课题, No. C-195
项目负责人: 孙万邦, 519041, 贵州省遵义市, 遵义医学院免疫学教研室。
wb-sun@263.com
电话: 0756-7623323 传真: 0756-7623328
收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-20

Immunogenicity of 28-31 ku outer membrane protein in *Campylobacter Jejuni*

Sheng-Jun Feng, Wan-Bang Sun, Xin-Sheng Yao, Zheng Xiao

Sheng-Jun Feng, Wan-Bang Sun, Xin-Sheng Yao, Zheng Xiao,
Department of Immunology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003,
Guizhou Province, China
Supported by the Foundation for Social Development of Guizhou
Province, No. C-168 and the Governor Foundation for Excellent Talent
of Guizhou Province, No. C-195
Correspondence to: Dr. Wan-Bang Sun, Department of Immunology,
Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China.
wb-sun@263.com
Received: 2004-07-27 Accepted: 2004-08-16

Abstract

AIM: To explore immunogenicity of 28-31 ku outer membrane protein of *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) and to pave the way for preparation of *C. jejuni* subunit vaccine.

METHODS: BALB/c mice were divided into normal control group, control group and immune group. Mice in immune group were subcutaneously (SC) injected 28-31 ku protein (Pur) or glycine extraction (A), adding or without adding the complete Freud's adjuvant (F). Mice in control group were treated with F and saline. Each mouse received five times of immunization at an interval of 6 days. At 10th day after the final immunization, the specific antibodies' titer in serum was measured with double immunodiffusion test. ELISA method was used to detect the specific IgG, IgA antibodies in serum and intestinal fluid.

RESULTS: After treated with different doses of antigen, the levels of specific IgG, IgA or secretory IgA (SIgA) antibodies in serum and intestinal fluid were significantly higher in immune group than those in normal control or control group ($P < 0.05$). No significant difference existed between normal control and control group.

CONCLUSION: Outer membrane protein of *C. jejuni* with molecular mass of 28-31 ku is a fine immunogen and it can induce response of specific antibodies in BALB/c mice. It may be used as a promising component of sub-

unit vaccine.

Feng SJ, Sun WB, Yao XS, Xiao Z. Immunogenicity of 28-31 ku outer membrane protein in *Campylobacter Jejuni*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(12):2813-2816

摘要

目的: 探讨空肠弯曲菌 28-31 ku 外膜蛋白的免疫原性。

方法: 将 BALB/c 小鼠分为正常对照组和不同剂量抗原的免疫组, 正常对照组不予抗原免疫, 而免疫组采用 28-31 ku 蛋白(纯)或甘氨酸提取的外膜蛋白(粗), 分别加用或不用完全弗氏佐剂(F), 采用 sc, 在 0, 1, 2, 3, 4 wk 免疫, 于末次免疫后 10 d, 用双向免疫琼脂扩散试验测定各免疫组抗血清效价, 待效价达到 1:4 至 1:16 时, 分别采集各免疫组及对照组小鼠的血清、空肠及回肠内的肠液, 用间接 ELISA 法检测各组标本的特异性抗体 IgA, IgG。

结果: 不同剂量的抗原 sc 免疫 BALB/c 小鼠后, 免疫组血清及肠液中特异性 IgA, IgG 抗体水平较正常对照组及实验对照组显著升高 ($P < 0.05$)。

结论: 空肠弯曲菌的 28-31 ku 外膜蛋白是一种良好的免疫原, 能够诱导 BALB/c 小鼠产生特异性抗体, 可能成为空肠弯曲菌亚单位疫苗候选的重要组分。

冯胜军, 孙万邦, 姚新生, 肖政. 空肠弯曲菌 28-31 ku 外膜蛋白的免疫原性. *世界华人消化杂志* 2004;12(12):2813-2816
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2813.asp>

0 引言

空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*, *C. jejuni*)作为一种人兽共患病病原体, 系最常见的胃肠道炎症的致病菌之一^[1-2], 还是 Guillain-Barre 综合征和 Miller Fisher 综合征的常见致病病原体^[3-8], 其血清型繁多^[9-10], 并且 *C. jejuni* 由于存在分子模拟等成分, 制备的全菌苗, 以及 *C. jejuni* 突变株菌苗^[11]提供的保护性效果有限, 而不安全. 在亚单位组分的提取上, 众多血清型菌株分布, 使得 *C. jejuni* 共同抗原具有保护性的组分的鉴定及提取增加了难度, 同时也为 *C. jejuni* 疫苗的研制增加了阻力. 并且, 随着 *C. jejuni* 耐药菌株的增加^[12-13], 研究安全、有效的 *C. jejuni* 亚单位疫苗具有重要的预防作用. 对于 *C. jejuni* 的亚细胞成分的研究最多的是其鞭毛蛋白^[14], 但获得的保护性有限, 并且在不同来源的 *C.*

jejuni 菌株间提供了不稳定的保护性. 本研究中, 我们参照 Pei *et al*^[15] 的方法, 对 *C. jejuni* 28–31 ku 外膜蛋白进行免疫原性研究, 为深入探讨 *C. jejuni* 的有效的保守性亚单位组分奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*, *C.jejuni*) 标准株(CF-1, 购于上海市疾病预防控制中心菌种保存中心, 由中国科学院从腹泻肠炎患者中分离); BALB/c 小鼠清洁级, 6–8 wk 龄, 健康, 质量 18–25 g, ♂, 购于重庆医科大学, 常规饲养; HRP 标记羊抗小鼠 IgG 抗体 HRP 标记羊抗小鼠 IgA 抗体购于 Southern Biotech 公司; 蛋白酶抑制剂购于 Amersham 公司; 小牛血清购于中德三利生物制品厂; OPD 购于 Sigma 公司; 卡介苗购于中科院成都生物制品研究所; 改良布氏血琼脂培养基参照文献[16]配制.

1.2 方法 *C.jejuni* 在改良布氏血琼脂培养基中培养, 在 42.5 °C, 气体条件 50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 850 mL/L N₂ 条件下培养 48 h. 取出, 用灭菌双蒸水洗刮下 *C.jejuni* 菌苔, 室温 4 000 g, 20 min 离心洗涤菌液. 重复洗涤 1 次, 去掉上清液, 取出 CJ 菌泥, 称重, 按每 4 g CJ 菌泥加入 0.2 mol/L、pH 2.2 甘氨酸–盐酸缓冲液 120 mL, 4 °C 搅拌 30 min, 然后在 4 °C 条件下 12 000 g, 离心 15 min. 透析, 用固体聚乙二醇 6 000 包埋浓缩, 该透析物为 *C.jejuni* 粗提物. 然后将该粗提物通过 Sephadex G-75 纯化, 获得 *C.jejuni* 的 28–31 ku 外膜蛋白, 80 mL/L 浓缩胶、120 mL/L 分离胶作 SDS–PAGE 分子质量鉴定. 蛋白质定量采用 Bradford 法蛋白定量. 抗原制备采用本室制备的福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂, 无菌操作, 4 °C 保存, 备用.

1.2.1 动物分组免疫 小鼠 48 只, 随机分组, 每组 6 只, 共 8 组(表 1): 实验对照组采用福氏完全佐剂 0.2 mL + 生理盐水 0.2 mL sc(NS+F 组); 正常对照组不进行任何免疫处理. 上述动物均常规饲养. 免疫方法均采用背部皮下+腹部皮下多点注射. 加有福氏完全佐剂的疫苗按 0.2 mL 混合 0.2 mL 抗原(*C.jejuni* ku–31 ku 外膜蛋白或 *C.jejuni* 甘氨酸提取物), 未加福氏完全佐剂用灭菌生理盐水 0.2 mL 代替. 每次每只小鼠共 0.4 mL. 每隔 6 d sc 1 次, 共五次. 全程 40 d(包括末次采血采用双向免疫琼脂扩散试验检测抗体效价的 10 d). 免疫期间观察进食、大便、毛皮、四肢、体重、活动、死亡等情况.

1.2.2 小鼠血清中抗体效价检测 每组取 2 只小鼠, 摘眼球从眼眶采血, 常规分离血清, 作双向免疫琼脂扩散试验检测血清中抗体效价. ELISA 法检测血清 IgG, IgA 及肠液中 IgG, SIgA 水平: 经眼眶采血, 在采集前 10 h 禁食. 常规方法分离血清. 肠黏液收集, 在采集前 10 h 禁食. 眼眶采血处死后, 立即取空肠和回肠 5 cm. 于 Eppendorf 管中, 加入胰蛋白酶抑制剂/PBS 溶液 0.5 mL, 用剪刀剪碎肠段, 并轻微搅拌约 30 min. 置 4 °C 冰箱保存 10 h.

4 °C 离心, 13 000 g, 15 min. 收集上清液. 4 °C 保存, 备用. 用样本稀释液将血清按 1 : 100 稀释, 4 °C 保存. 用样本稀释液将肠黏液按 1 : 10 稀释, 4 °C 保存. *C.jejuni* 甘氨酸提取物(pH 7.0, 浓度 1 g/L), 100 μL/孔, 封板. 置湿盒中, 37 °C 孵育 4 h. 弃去孔中液体, 50 mL/L 小牛血清/PBS 液 4 °C 封闭 24 h. 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min. 加入稀释好的样品(血清或肠黏液) 100 μL/孔, 封板. 湿盒, 37 °C 孵育 60 min. 洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min. 加入 HRP 标记 IgG 或 IgA 抗体, 100 μL/孔, 封板. 置湿盒, 37 °C 孵育箱中, 60 min. 加入底物液 100 μL/孔, 封板. 置湿盒, 37 °C 孵育 15 min. 加入终止液(2 mol/L H₂SO₄ 溶液) 50 μL/孔, 终止反应. 酶标仪 490 nm 波长读取 A 值. 空白对照组为 0.1 mol/L, pH 7.4 PBS. 阳性结果 P/N ≥ 2.1, 即疫苗免疫组的样本测定孔的 A 值(P)–空白对照组值/正常对照组测定孔的 A 值(N)–空白对照组值 ≥ 2.1; 阴性结果 P/N ≤ 2.1. 即疫苗免疫组的样本测定孔的 A 值(P)–空白对照组值/正常对照组测定孔的 A 值(N)–空白对照组值 ≤ 2.1.

统计学处理 各组血清或黏液中的 A 值以均数 ± 标准差(mean ± SD)表示. 采用 SPASS V10.0 统计软件处理, 进行方差齐性检验后, 进行 t 检验、方差分析和相关性分析进行组间比较.

2 结果

C.jejuni 甘氨酸提取物进行 Sephadex G-75 分子筛层析, 然后 SDS–PAGE, 可以发现本次纯化出了分子质量为 28–31 ku 的外膜蛋白质, 且纯度较高(图 1). 免疫期间小鼠每次注射后前 16 h, 食量减少, 之后逐渐恢复至正常水平; 无稀便、干结; 毛发倒立、紊乱; 在第 2 次注射 1 d 后, 加有完全福氏佐剂组均有四肢关节肿胀、发红现象出现, 并伴眼睑红肿、结膜充血, 分泌物增加, 活动受限; 体质量明显减轻, 分别减少 1–5 g 左右; 活动迟缓; 无死亡.

2.1 小鼠后的血清特异性抗体效价在小鼠皮下多点注射后达 1 : 4–1 : 16(表 1).

表 1 小鼠免疫血清抗体效价

分组	双向免疫琼脂扩散试验
(1) 50 μg(纯)+F	1 : 4–1 : 8
(2) 50 μg(粗)+F	1 : 4–1 : 16
(3) 100 μg(纯)+F	1 : 4–1 : 16
(4) 100 μg(粗)+F	1 : 4–1 : 16
(5) 100 μg(纯)	1 : 4–1 : 8
(6) 100 μg(粗)	1 : 4–1 : 16
(7) 200 μg(纯)+F	1 : 4–1 : 16
(8) 200 μg(粗)+F	1 : 4–1 : 16

纯: 提取的 *C.jejuni* 28–31 ku 外膜蛋白; 粗: *C.jejuni* 甘氨酸提取物; F: 完全福氏佐剂.

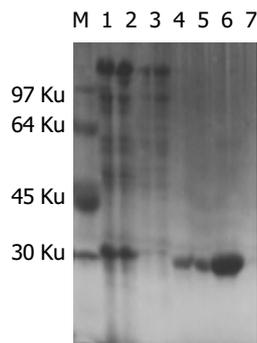


图1 *C.jejuni* 甘氨酸提取物 Sephadex G-75 纯化后 SDS-PAGE 分析. M: Marker; 1; 2: *C.jejuni* 甘氨酸提取物的 SDS-PAGE 条带; 3, 4: *C.jejuni* 的 67 ku、97 ku、108 ku 外膜蛋白; 5, 6, 7: *C.jejuni* 28-31 ku 外膜蛋白.

2.2 血清和肠黏液 IgG, IgA 抗体 BALB/c 小鼠经过 sc *C.jejuni* 外膜蛋白 28-31 ku 免疫 5 次后 10 d, 各免疫组特异性抗体 IgG, IgA 水平均较实验对照组或正常对照组显著升高 ($P < 0.05$), 而实验对照组与正常对照组间抗体水平无差异 ($P > 0.05$, 表 2).

3 讨论

26-30 ku 蛋白介导 *C.jejuni* 体外黏附 HeLa 细胞, 其中 27 ku 蛋白是 *C.jejuni* 的特异性成分, 目前研究表明 27 ku 就是 28 ku. Peit *et al*^[15] 认为 *C.jejuni* 的甘氨酸提取物中蛋白质 PEB1 (28 ku) 和 PEB3 (30 ku) 分子, 具有保守性, 无血清型改变, 能够作为检测不同血清学来源的 *C.jejuni* 共同的 PEB1 组分具有高度的免疫原性并有黏附真核细胞的能力. 而 29 ku 及 31 ku 多肽亦是甘氨酸提取物中的主要抗原成分, 并有研究表明该蛋白存在于整个 *C.jejuni* 菌体表面, 亦是 *C.jejuni* 共同抗原, 可作为 *C.jejuni* 的候选^[17]. 为了鉴定纯化的 *C.jejuni* 28-31 ku

外膜蛋白质(图1)或甘氨酸提取物(其中含有28-31 ku蛋白质)的免疫原性, 我们采用注射免疫小鼠的方法收集资料. 由于该类蛋白质分子量较小, 为了增强免疫原性, 采用福氏完全佐剂作为该类蛋白质的佐剂. 对 BALB/c 小鼠通过 sc 间隔 6 d 接种 5 次. 检测免疫组的血清中特异性抗体的效价, 采用双向琼脂扩散试验表明该抗体效价在 1:4-1:16 之间(表 2). 并且, 在 28-31 ku 纯化物中, 出现了单一的白色沉淀线(即 28-31 ku 与其抗体的复合物). 用间接 ELISA 检测血清或肠道中特异性 IgG 或 IgA 抗体水平, 以 A 值表示, 抗体效价采用 $P/N \geq 2.1$ 为阳性, $P/N < 2.1$ 为阴性进行结果分析, 发现免疫组的抗体分泌水平较对照组有显著升高 ($P < 0.05$). 由此表明 *C.jejuni* 的 28-31 ku 抗原或 *C.jejuni* 甘氨酸提取物均能够诱导血清或肠道中有效的特异性抗体 IgG, IgA, SIgA 产生. 采用福氏完全佐剂, 其缺点是 sc 操作不便, 在多点注射时, 由于卡介苗导致的局部皮肤的炎症反应, 容易形成皮下囊肿, 影响抗原的完全吸收, 小鼠注射局部的皮下出现囊肿可以证实. 我们在第 2 次免疫后, 观察到小鼠的关节肿胀、发红的炎症反应, 与报道的该类佐剂能够诱导佐剂性关节炎一致, 常用于复制佐剂性关节炎动物模型. 因此口服或皮下注射用佐剂上调抗原的免疫原性时, 可采用其他的佐剂取代, 如 CT、LT、脂质体等佐剂的单用或联合应用, 该项工作本课题组正在开展中. 由于 *C.jejuni* 是通过粪-口途径感染, 因此作为抗胞外菌的 *C.jejuni* 而言, 黏膜免疫的研究具有了重要地位, 可以深入研究微粒体疫苗通过口服方式获得免疫力, 而以脂质体等为代表的免疫佐剂的联合应用具有了广阔的前景, 采用脂质体制备抗原包裹的微粒, 可克服口服时胃酸等肠液对抗原的破坏, 刺激小鼠产生 Th1 型免疫应答, 这正是我们的下一

表 2 小鼠血清及肠道中抗体水平

分组	n	Serum		Intestinal fluid	
		IgG	IgA	IgG	sIgA
(1) 50 μ g(纯)+F	6	1.71 \pm 0.04 ^a	0.15 \pm 0.01 ^a	1.50 \pm 0.12 ^a	0.71 \pm 0.07 ^a
(2) 50 μ g(粗)+F	6	1.78 \pm 0.03 ^a	0.19 \pm 0.01 ^a	1.56 \pm 0.04 ^a	0.50 \pm 0.08 ^a
(3) 100 μ g(纯)+F	6	1.71 \pm 0.08 ^a	0.17 \pm 0.01 ^a	1.47 \pm 0.08 ^a	0.70 \pm 0.15 ^a
(4) 100 μ g(粗)+F	6	1.82 \pm 0.28 ^a	0.26 \pm 0.07 ^a	1.52 \pm 0.16 ^a	0.76 \pm 0.08 ^a
(5) 200 μ g(纯)+F	6	1.76 \pm 0.02 ^a	0.26 \pm 0.03 ^a	1.49 \pm 0.12 ^a	0.57 \pm 0.06 ^a
(6) 200 μ g(粗)+F	6	1.75 \pm 0.21 ^a	0.53 \pm 0.07 ^a	1.48 \pm 0.09 ^a	0.74 \pm 0.08 ^a
(7) 100 μ g(纯)	6	1.52 \pm 0.05 ^a	0.21 \pm 0.02 ^a	1.59 \pm 0.17 ^a	0.49 \pm 0.05 ^a
(8) 100 μ g(粗)	6	1.64 \pm 0.34 ^a	0.18 \pm 0.01 ^a	1.53 \pm 0.12 ^a	0.52 \pm 0.13 ^a
(9) NS+F	6	0.21 \pm 0.16 ^b	0.121 \pm 0.07 ^c	0.23 \pm 0.14 ^c	0.22 \pm 0.16 ^c
(10) 正常对照	6	0.20 \pm 0.17	0.11 \pm 0.05	0.22 \pm 0.17	0.21 \pm 0.20
空白对照	6	0.12 \pm 0.02	0.10 \pm 0.04	0.15 \pm 0.015	0.20 \pm 0.12

纯: *C.jejuni* 28-31 ku 外膜蛋白; 粗: *C.jejuni* 甘氨酸提取物; F: 完全福氏佐剂. ^a $P < 0.05$ vs NS+F 组、正常对照组、空白对照组; ^b $P < 0.05$ vs 正常对照组、空白对照组.

步工作的重点, 在本实验中, 采用福氏完全佐剂的免疫调节作用, 证实了 *C.jejuni* 的 28-31 ku 分子是一种良好的免疫原, 能够诱导 BALB/c 小鼠产生特异性抗体. 该类蛋白质的研究能够为 *C.jejuni* 亚单位疫苗的研制打下初步基础.

4 参考文献

- 1 Isenbarger DW, Hien BT, Ha HT, Ha TT, Bodhidatta L, Pang LW, Cam PD. Prospective study of the incidence of diarrhoea and prevalence of bacterial pathogens in a cohort of vietnamese children along the red river. *Epidemiol Infect* 2001;127:229-236
- 2 Baqar S, Rice B, Lee L, Bourgeois AL, El Din AN, Tribble DR, Heresi GP, Mourad AS, Murphy JR. Campylobacter jejuni enteritis. *Clin Infect Dis* 2001;33:901-905
- 3 Yuki N. Pathogenesis of Guillain-Barre and miller fisher syndromes subsequent to campylobacter jejuni enteritis. *Jpn J Infect Dis* 1999;52:99-105
- 4 Godschalk PC, Heikema AP, Gilbert M, Komagamine T, Ang CW, Glerum J, Brochu D, Li J, Yuki N, Jacobs BC, van Belkum A, Endtz HP. The crucial role of Campylobacter jejuni genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barre syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1659-1665
- 5 Nishimoto Y, Yuki N. Intravenous immunoglobulin therapy for Guillain-Barre syndrome in Japan: changes in treatment after its inclusion in health insurance coverage. *Rinsho Shinkeigaku* 2004;44:633-635
- 6 Kuwabara S, Ogawara K, Misawa S, Koga M, Mori M, Hiraga A, Kanesaka T, Hattori T, Yuki N. Does Campylobacter jejuni infection elicit "demyelinating" Guillain-Barre syndrome? *Neurology* 2004;63:529-533
- 7 Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Taguchi K, Miyatake T, Furukawa K, Kobata T, Yamada M. Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and Campylobacter jejuni lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:11404-11409
- 8 Odaka M, Yuki N, Tatsumoto M, Tatenno M, Hirata K. Ataxic Guillain-Barre syndrome associated with anti-GM1b and anti-GalNAc-GD1a antibodies. *J Neurol* 2004;251:24-29
- 9 Sopwith W, Ashton M, Frost JA, Tocque K, O'Brien S, Regan M, Syed Q. Enhanced surveillance of campylobacter infection in the north west of England 1997-1999. *J Infect* 2003;46:35-45
- 10 Hopkins KL, Desai M, Frost JA, Stanley J, Logan JM. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli strains and its relationship with host specificity, serotyping, and phage typing. *J Clin Microbiol* 2004;42:229-235
- 11 Ziprin RL, Hume ME, Young CR, Harvey RB. Inoculation of chicks with viable non-colonizing strains of Campylobacter jejuni: evaluation of protection against a colonizing strain. *Curr Microbiol* 2002;44:221-223
- 12 Nachamkin I, Ung H, Li M. Increasing fluoroquinolone resistance in campylobacter jejuni, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1501-1503
- 13 Rautelin H, Vierikko A, Hanninen ML, Vaara M. Antimicrobial susceptibilities of campylobacter strains isolated from finnish subjects infected domestically or from those infected abroad. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:102-105
- 14 Lee LH, Burg E 3rd, Baqar S, Bourgeois AL, Burr DH, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P. Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against Campylobacter jejuni. *Infect Immun* 1999;67:5799-805
- 15 Pei ZH, Ellison RT 3rd, Blaser MJ. Identification, purification, and characterization of major antigenic protein of campylobacter jejuni. *J Biol Chem* 1991;266:16363-16396
- 16 李影林. 中华医学检验全书(上卷). 北京: 人民出版社, 1996:1023-1173
- 17 Kervell M, Pages JM, Pei Z, Grollier G, Blaser MJ, Fauchere JL. Isolation and characterization of two Campylobacter glycine-extracted protein that bind to HeLa cell membrane. *Infect Immun* 1993;61:3440-3448

World Journal of Gastroenterology 审稿要点

《World Journal of Gastroenterology, WJG》根据编委的审稿意见, 来稿分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审等项处理. WJG 为了确保其出版的每篇论文的学术质量, 特制定了以下评审要点. (1)题名: 是否准确反映了研究工作的科学问题, 内容是否简明而有特色. 若不符, 请提出具体修改意见. (2)摘要: 是否明确指出了研究的背景与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论, 创新点和重点科学问题是否与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论相符. (3)引言: 是否包括该研究的目的是与其他相关研究的关系. (4)材料和方法: 有无特色, 如大样本、安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验、特殊病例、细胞或组织样品; 研究方法和技术有无创新性、系统性或特色. 改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求, 实验对照的设计是否合理可靠, 统计学处理方法的使用是否恰当. (5)结果: 是否能得出较明确的科学结论, 实验证据是否充足. 临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果. (6)讨论: 是否条理分明, 有无系统的理论分析和有价值的科学结论. (7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分, 特别是最新文献的引用情况. (8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.