

世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2004 年 2 月 15 日 第 12 卷 第 2 期 (Volume 12 Number 2)



2/2004

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2004 年 2 月 15 日

第 12 卷

第 2 期

(总第119期)

述 评

253 肝炎病毒蛋白对肝细胞基因组转录调节及信号转导机制的影响 成军

胃 癌

258 胃癌线粒体DNA拷贝量的变化 韩琤波, 李凡, 杨雪飞, 毛晓韵, 吴东瑛, 辛彦

262 胃癌前病变p21^{ras}, c-erbB-2, p53表达与中医证候的关系 胡玲, 劳绍贤

266 胃癌淋巴结转移预测的多因素分析 黄宝俊, 徐惠绵, 赵雨杰, 王天骄, 田大彤, 陈峻青

肝 癌

271 人鼠嵌合Fab抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原HAb18G嵌合Fab抗体的表达
邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南

276 肝癌细胞H₂₂与树突状细胞杂交瘤苗的实验研究
张娟, 张锦堃, 卓少宏

280 肝细胞癌hOGG1 mRNA及其蛋白的表达
周秀敏, 林菊生, 章金艳, 张莉, 周鹤俊

283 小鼠AFP-CTLA4融合蛋白真核表达载体的构建及鉴定 田耕, 易继林

病毒性肝炎

286 丙型肝炎病毒核心蛋白结合视黄醇脱氢酶11蛋白
成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟

291 丙型肝炎病毒非结构蛋白5A结合蛋白37小鼠同源基因的克隆化及结构分析
成军, 李克, 王琳, 陆荫英, 刘妍, 钟彦伟

298 新生儿HBe Ag在HBV宫内感染中的作用 邵中军, 门可, 徐剑秋, 徐德忠, 闫永平, 张景霞

302 应用抑制性消减杂交技术筛选TAHCCP2的反式调节基因
王建军, 刘妍, 成军, 杨倩, 纪冬, 党晓燕, 徐志强, 王春花

306 基因表达谱芯片筛选NS5ATP3转染细胞差异表达基因
刘妍, 杨倩, 成军, 王建军, 纪冬, 党晓燕, 王春花

311 基因表达谱芯片技术筛选NS5A-TP4蛋白反式调节基因
杨倩, 成军, 刘妍, 王建军, 洪源, 张树林

315 HCV包膜糖蛋白E2基因的克隆、蛋白表达及纯化 杜德伟, 贾战生, 秦鸿雁, 刘秋平, 周永兴, 韩 骅

319 应用表达谱芯片技术对NS5ATP7反式调节基因的研究
张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 梁耀东, 李强, 刘 敏

323 应用表达谱芯片技术筛选NS5ATP9反式调节基因的研究
李强, 梁耀东, 成军, 王琳, 王建军, 张健, 刘妍, 程明亮

327 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒反式调节靶基因的抑制性消减杂交和基因芯片分析结果的比较
成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 杨倩, 王琳

332 多对型特异性引物巢式PCR检测湖南省乙肝病毒基因型 温志立, 谭德明

基础研究

336 人肝素酶基因正反义腺病毒表达载体的构建及鉴定
蔡永国, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉, 杨孟华, 王东旭

339 正常与硬化肝组织基因表达差异的初步分析
刘连新, 陈志宏, 武林枫, 李宏伟, 刘芝华, 姜洪池, 王秀琴, 吴 旻

344 癌基因对大鼠肝卵圆细胞分化和转化的影响 廖 冰, 薛 玲, 何萍, 赵国强, 车丽洪

347 中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和Ic-fos表达
杨 玲, 朱清静, 笪邦红, 张赤志

	<p>351 实验性肝硬化大鼠小肠血红素氧合酶的表达 田德安, 周晓黎</p> <p>355 胃黏膜保护剂预防幽门螺杆菌培养上清液所致小鼠胃黏膜损伤 崔梅花, 胡伏莲, 董欣红</p> <p>359 结肠充气CT对检测大肠肿瘤的敏感性和特异性 王毅, 龚水根, 张伟国, 陈金华, 张连阳, 陈金萍</p> <p>363 胃溃疡大鼠胃泌素、生长抑素和GD细胞的变化 孙凤莲, 宋于刚, 覃汉荣</p> <p>367 当归多糖对大鼠乙酸性结肠炎的保护作用 刘少平, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平, 吴东方</p> <p>371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响 周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球</p>
临床研究	<p>376 恶性腹水基质金属蛋白酶活性分析 孙晓敏, 董卫国, 余保平, 罗和生, 于皆平</p> <p>379 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白4蛋白表达的关系 周正, 劳绍贤, 黄志新, 张向菊, 黄烈平, 匡忠生</p> <p>382 肠易激综合征患者肠黏膜肥大细胞的变化 王静, 梁列新, 张志雄, 李国华, 钱伟, 侯晓华</p> <p>385 MRI评估肝硬化再生结节和退变结节 徐海波, 孔祥泉, 熊茵, 冯敢生</p>
焦点论坛	<p>390 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>391 乙型肝炎病毒DNA聚合酶末端蛋白研究进展 陈国凤, 成军, 张玲霞, 李莉</p> <p>393 乙型肝炎病毒DNA 多聚酶P结构域研究进展 陈国凤, 成军, 王琳, 张玲霞, 李莉</p> <p>397 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对转录因子ATF-1的调节 王春花, 成军, 郎振为, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕</p> <p>401 乙型和丙型肝炎病毒与胱冬肽酶3的关系 纪冬, 成军, 王建军, 刘妍, 杨倩, 党晓燕, 王春花</p> <p>403 乙型和丙型肝炎病毒对转录因子Nur77的调节 成军</p> <p>406 乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒对层粘连蛋白表达的调节 王建军, 成军, 刘妍, 杨倩, 纪冬, 王春花</p> <p>408 转录因子C/EBPb的生物学功能 成军</p> <p>412 活性氧簇与肝炎病毒的关系 梁耀东, 成军, 吴君, 程明亮</p> <p>414 趋化因子与病毒性肝炎的关系 陆荫英, 成军, 张玲霞</p> <p>417 病毒性肝炎发病机制中环氧合酶的作用 刘敏, 成军, 张树林</p>
文献综述	<p>420 乙型肝炎病毒DNA整合的机制及后果 成军</p> <p>428 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化 郑伟达, 王小众</p> <p>432 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病 贾林</p> <p>434 右叶部分肝移植临床解剖进展 刘静, 高毅, 钟世镇</p> <p>439 肝素酶: 抗肿瘤转移的新靶点 陈陵, 杨仕明, 房殿春, 王东旭</p> <p>443 肠道上皮特异性基因CDX2 宋艳, 李凌</p> <p>446 细胞凋亡与肝移植免疫耐受 刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维</p> <p>450 自身免疫性肝炎诊断与治疗 欧强, 谭德明</p> <p>454 VEGF在肝癌中作用 邓靖宇, 何生</p>
研究快报	<p>459 胰腺癌组织中COX-2和Bcl-2蛋白的表达及其意义 刘希双, 李玉军, 田宇彬, 张翠萍, 孙显路, 魏良洲, 薛会光, 刘思良</p> <p>461 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较 陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀</p> <p>464 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响 黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇</p> <p>467 MUC5AC蛋白在大肠肿瘤中的表达及意义 卜晓东, 李俐, 黄培林, 樊克武, 赵建华</p> <p>469 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒</p> <p>471 肛管直肠原发性恶性黑色素瘤临床病理特点 赵尔增, 张建中, 岳茂兴</p> <p>473 细胞周期蛋白D1 RT-PCR ELISA的建立及其初步应用 陈兵, 张雪, 府伟灵, 常杭花, 刘为纹, 徐采朴, 史景泉</p> <p>476 胃肠激素与不同类型反流所致食管炎的相关性 王雯, 李兆申, 许国铭, 张志坚, 林克荣</p> <p>477 尼美舒利对结肠癌细胞ICAM-1 mRNA表达的影响 刘伟, 张超</p>

临床经验

- 480 腹腔镜次/全结肠切除术治疗结肠慢传输性便秘4例 张连阳, 刘宝华, 陈金萍, 文亚洲
- 481 内镜下氩离子凝固术治疗胃肠息肉 毛振彪, 黄介飞, 陆静娴, 俞智华, 倪润洲
- 483 肝硬化门脉系统食管侧支血流动力学与血浆内皮素的关系 肖际东, 李瑞珍, 周平, 朱文晖
- 485 大黄与促肝细胞生长素联合治疗重型肝炎 黄以群, 林珍辉, 纪树梅, 王喻, 王崇国
- 487 5 km长跑对新兵胆囊排空及胃肠激素的影响 李小丽, 郝悦, 杨凤江, 邹勤, 李智力, 李晓春
- 488 药物性肝病41例 苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅
- 490 数字化成像结肠双对比造影检查345例 何发清, 官泳松, 王小林, 郭兵文, 孙龙
- 492 胃十二指肠隐匿性穿孔的诊断与治疗4例 詹世林, 吴良平, 蒲森水
- 494 胃癌及癌前病变中胃黏膜上皮细胞增生及凋亡相关基因蛋白表达 孟华, 刘丽娜, 吕申
- 497 胃十二指肠疾病与幽门螺杆菌感染的相关性分析 周惠萌, 范欣敏
- 499 原发性胆汁性肝硬化37例临床分析 董正芳, 程留芳
- 501 射频消融联合局部热化疗治疗特殊部位肝脏恶性肿瘤 田伏洲, 陈涛, 蔡忠红, 陈琪
- 503 卵巢巨大巧克力囊肿误诊为结核性腹膜炎7 a 1例 冯莉娟, 张桂英, 陈凤英, 晏仲舒

封面故事

- 371 达纳康对大鼠溃疡性结肠炎细胞因子的影响
周燕红, 于皆平, 何小飞, 余细球 世界华人消化杂志 2004; 12(2): 371-375
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v12/i2/371.htm>

国际会议

- 13th United European Gastroenterology Week, UEGW
October 15-20, 2005
- American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting
October 28-November 2, 2005
- ISGCON 2005
November 11-15, 2005
isgcon2005@yahoo.co.in
www.isgcon2005.com
- Advanced Capsule Endoscopy Users Course
November 18-19, 2005
www.asge.org/education
- II Latvian Gastroenterology Congress
November 29, 2005
gec@stradini.lv
www.gastroenterologs.lv
- 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases
December 1-3, 2005
c.chase@imedex.com
www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm
- 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus
February 22-25, 2006
isde@sapmea.asn.au
www.isde.net

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
(半月刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2004-02-15
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 中文编辑 潘伯荣 张海宁

英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪

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

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

世界华人消化杂志被评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.

2005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576.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

- 12 Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in APC β 716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2(COX-2). *Cell* 1996;87:803-809
- 13 Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T, Yoshida S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer* 2001; 91:333-338
- 14 Reed JC. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995;9:451-473
- 15 Lu QL, Abel P, Foster CS, Lalani EN. Bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 1996;27:102-110
- 16 Du M, Singh N, Hussein A, Isaacson PG, Pan L. Positive correlation between apoptotic and proliferative indices in gastrointestinal lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue(MALT). *J Pathol* 1996;178:379-384
- 17 Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E_2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362-366
- 18 Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, Rigas B. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence, and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *J Clin Invest* 1995;96:491-503
- 19 Hao X, Bishop AE, Wallace M, Wang H, Willcocks TC, MacLough J, Polak JM, Knight S, Talbot IC. Early expression of cyclooxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1999;187:295-301

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

3 种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较

陈 健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀

陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀, 宁波大学医学院 浙江省宁波市 315211
浙江省医药卫生科研基金资助项目, No. 2002A073
宁波市重点博士基金资助项目, No. 02J20101-07
宁波大学重点科研项目, No. z0214015
项目负责人: 郭俊明, 315211, 浙江省宁波市镇海西路 1211 号, 宁波大学医学院. junmingguo@yahoo.com
电话: 0574-87600758 传真: 0574-87608638
收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-09-18

摘要

目的: 建立一种富集胃癌患者外周血中癌细胞的有效方法。

方法: 先将不同浓度胃癌MGC-803细胞加入到健康人外周血中, 再用淋巴细胞分离液收集单核细胞, 然后等分成3份, 并用3种方法处理-A方法, 用CD45磁珠去除白细胞; B方法, 用Ber-EP4磁珠富集癌细胞; C方法, 先后使用上述2磁珠。最后用定量RT-PCR检测看家基因 β 2微球蛋白(β 2MG)mRNA的量。同法检测30例胃癌患者外周血。

结果: β 2MG mRNA扩增曲线的交叉点(crossing point, Cp)数值与癌细胞数间有良好的负相关(方法A, $P < 0.05$, 方法B或C, $P < 0.01$)。方法C检测到的Cp值为3种方法中最大的; 其灵敏度为1 mL血中含有1个癌细胞。用A、B和C方法检测30例胃癌患者外周血癌细胞的阳性率分别为70.00%, 60.00%和36.57%(C与A比较, $\chi^2=5.79$, $P < 0.05$; C与B比较, $\chi^2=4.92$, $P < 0.05$)。

结论: 在检测胃癌患者外周血癌细胞的实验中, 联用阴性和阳性免疫磁珠可减少来自外周血白细胞的污染。

陈健, 郭俊明, 金之瑾, 肖丙秀. 3种富集胃癌患者外周血中胃癌细胞方法的比较. 世界华人消化杂志 2004;12(2):461-464

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/461.asp>

0 引言

现代肿瘤学认为, 实体恶性肿瘤的血道转移是一相对早期事件^[1]。在外周血中发现瘤细胞的患者应采取有效的监测措施。胃癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 建立检测外周血胃癌细胞的有效方法显得非常必要。免疫磁珠技术是近年来发展起来的一种新技术, 已被应用于肿瘤学领域中^[2-4]。为建立一种较为理想的富集外周血实体瘤细胞的方法, 本研究比较了采用阴性、阳性免疫磁珠和联用2磁珠富集胃癌患者外周血癌细胞的情况。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌30例取自2002-08/2003-03在宁波大学医学院附属医院的住院患者, 均经病理确诊。男19例, 女11例, 年龄 65 ± 12 岁。临床分期: I期3例, II期6例, III期8例和IV期13例。人胃黏膜腺癌细胞系MGC-803购自中国科学院上海细胞库。RPMI-1640培养液为美国Gibco BRL公司产品。小牛血清为杭州四季青公司产品。抗人CD45免疫磁珠和抗人Ber-EP4免疫磁珠分别购自宁波新芝生物科技股份有限公司和挪威Dyna公司。RNeasy Mini RNA提取试剂盒和SYBR Green一步法逆转录-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒均由德国Qiagen公司生产。LightCycler荧光定量PCR仪由德国Roche公司生产。

1.2 方法

1.2.1 胃癌细胞稀释实验 MGC-803细胞置于含100 mL/L小牛血清的RPMI-1640培养液中, 37°C 、50 mL/L CO_2 培养。细胞用0.5 g/L EDTA消化后准确计数。用磷酸盐缓冲液(PBS)将细胞稀释后加入到健康人血中, 使每毫

升含癌细胞数分别为 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 , 1 .

1.2.2 单核细胞分离 取患者外周血或上述制备的含胃癌细胞的血液 4 mL, EDTA 抗凝. 用等体积 Hank' s 液稀释, 然后用淋巴细胞分离液分离单核细胞(mononuclear cells, MNC).

1.2.3 实验方法分类 获得的 MNC 等分成 3 份, 分别进行处理: (1)A 方法(阴性磁珠法): 加入 25 μ L (1×10^7) 抗人 CD45 免疫磁珠, 室温下混匀 30 min. 在磁场中吸取上清, 1 000 rpm 室温下离心 5 min, 收集细胞. (2)B 方法(阳性磁珠法): 加入 25 μ L (1×10^7) 上皮细胞特异性的抗人 Ber-EP4 免疫磁珠, 混匀 30 min (4 $^{\circ}$ C). 在磁场中放置 3 min (4 $^{\circ}$ C), 弃上清. 加 800 μ L PBS 清洗磁珠 5 次. (3)C 方法(联用阴性和阳性磁珠法): 先后使用 CD45 磁珠和 Ber-EP4 磁珠. 然后常规制作细胞涂片和 HE 染色. 按照 Mattsson et al [5] 报道的方法, 细胞结合 3 个及以上的磁珠为阳性.

1.2.4 总 RNA 提取 按 RNeasy Mini RNA 提取试剂盒说明书提取.

1.2.5 引物 扩增看家基因 β 2 微球蛋白(β 2 microglobulin, β 2MG)mRNA 的引物序列为: ACCCCCACTGAAAAAGATGA (正义链) 和 ATCTTCAAACCTCCATAGTG (反义链) [6].

1.2.6 荧光定量 RT-PCR 用 SYBR Green 一步法 RT-PCR 试剂盒在 LightCycler 荧光定量 PCR 仪上进行. 20 μ L 反应体积中含有 2 μ L RT-PCR 反应混合物, 引物 10 pmol, RNA 8 μ L. 逆转录反应在 50 $^{\circ}$ C 进行 20 min, 随后 95 $^{\circ}$ C 保温 15 min. PCR 反应的参数为: 94 $^{\circ}$ C 15 s, 50 $^{\circ}$ C 25 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环. β 2MG mRNA 的定量以扩增曲线的交叉点(crossing point, Cp)的数值来表示. 产物特异性经解链曲线分析确定.

统计学处理 应用 SPSS(10.0) 统计学软件对结果进行分析. 通过计算相关系数 r 来确定 Cp 值与细胞数的关系, 阳性率比较采用 χ^2 检验. 以 $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 细胞形态学观察 健康人血中加入 MGC-803 细胞, 经阴性磁珠筛选去除了绝大多数白细胞, 保留了癌细胞和少量白细胞(图 1). 用阳性筛选和联用阴、阳性磁珠富集的癌细胞与磁珠呈玫瑰花样结合(图 2, 3). 中间直径大者为胃癌细胞, 其余为白细胞.

2.2 MGC-803 细胞稀释实验结果 MGC-803 细胞加入到正常人外周血中, 经 3 种方法富集癌细胞, 然后用 RT-PCR 检测 β 2MG mRNA 的量(图 4A). 经解链曲线分析各方法扩增产物的 Tm 值一致, 并与阳性对照的 Tm 值吻合(图 4B). 说明 RT-PCR 的特异性好. 阴性对照均未见扩增, 表明无污染(图 4). β 2MG mRNA 的 Cp 值与细胞数成负相关(A 方法, $r=0.848$, $P < 0.05$; B 方法, $r=0.988$, $P < 0.01$; C 方法, $r=0.959$, $P < 0.01$; 表 1). 在含相等癌细胞的血液中, C 方法的 Cp 值均大于 A 和 B 方法的 Cp 值, 其灵敏度为每 mL 血含 1 个癌细胞(表 1).

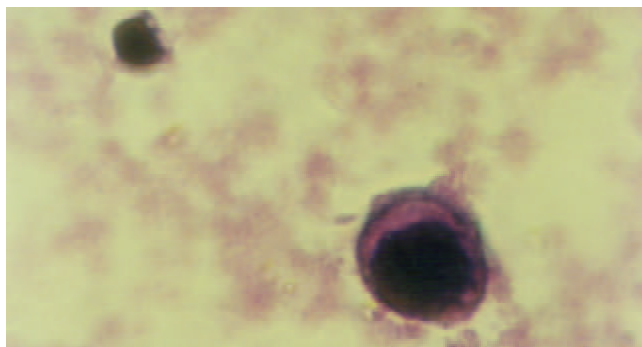


图1 用阴性免疫磁珠去除白细胞后检测到的胃癌细胞(HE染色, $\times 1\ 000$).

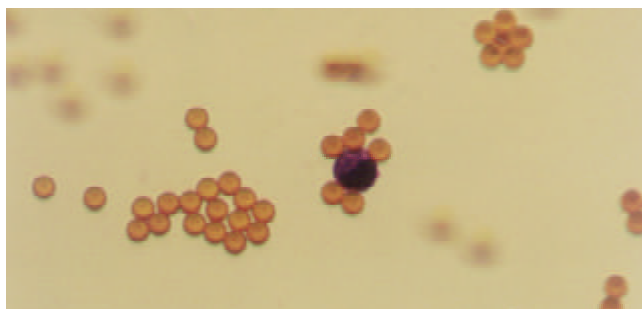


图2 用阳性免疫磁珠筛选到的胃癌细胞(HE染色, $\times 400$).



图3 联用阴性和阳性免疫磁珠筛选到的胃癌细胞(HE染色, $\times 1\ 000$).

表1 健康人血中加入胃癌细胞后 β 2MG mRNA RT-PCR 测定的 Cp 值

癌细胞数(n/mL)	A 方法 ^a	B 方法 ^b	C 方法 ^b
1×10^4	19.35	18.87	21.21
1×10^3	20.00	23.80	26.87
1×10^2	20.46	24.56	27.19
1×10^1	20.91	24.89	27.22
1×10^0	21.09	25.50	29.30

数据为 2 次 RT-PCR 结果的平均数. ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

2.3 胃癌患者 β 2MG mRNA 检测结果 由于细胞数与 Cp 值呈负相关(表 1), 故以各方法的最低检测灵敏度的 Cp 值作为阳性结果判断的临界值. 30 例胃癌患者的结果显示, A、B 和 C 方法的阳性率分别为 70.00%、60.00% 和 36.67%. C 与 A 比较, $\chi^2=5.79$, $P < 0.05$; C 与 B 比较, $\chi^2=4.92$, $P < 0.05$. C 方法阳性病例与病期的关系为: I 期 0.00% (0/3), II 期 33.33% (2/6), III 期 37.50% (3/8), IV 46.15% (6/13).

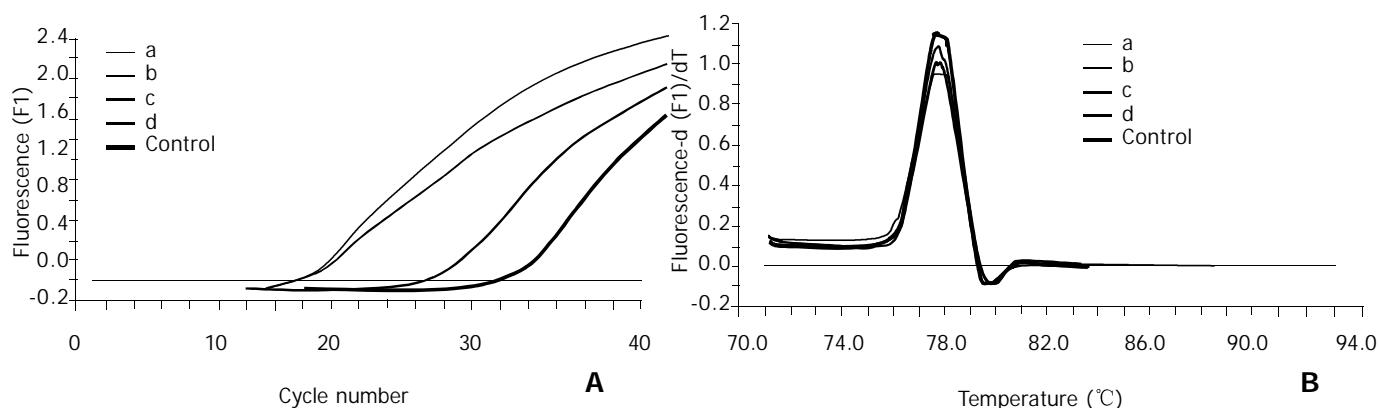


图4 $\beta 2$ 微球蛋白 mRNA 定量 RT-PCR 检测结果. (A) 及其解链曲线分析(B). a: 阳性对照, MNC 未经免疫磁珠筛选; b: 阴性免疫磁珠筛选; c: 阳性免疫磁珠筛选; d: 联用阴性和阳性免疫磁珠筛选; control. 无 RNA 对照.

3 讨论

外周血肿瘤微转移的检测对于治疗方案的选择具有重要意义, 而瘤细胞的富集可提高 RT-PCR、免疫组织化学、端粒酶活性分析和流式细胞术等分析肿瘤细胞方法的灵敏度和特异度^[2, 7-8]. 免疫磁珠可应用于富集外周血、淋巴结、胸腹水、尿液等中的癌细胞, 可分为阳性筛选和阴性筛选^[4]. 对于上皮性肿瘤来说, Ber-EP4 磁珠和 CD45 磁珠分别为阳性磁珠和阴性磁珠^[4, 7, 9].

根据荧光定量 RT-PCR 的原理, 扩增曲线的 Cp 值与被检测 mRNA 的拷贝数呈负相关, 可以代表 mRNA 的拷贝数^[10]. 有多项研究认为 $\beta 2$ MG 是最合适的参照基因^[11-13]. 定量检测 $\beta 2$ MG mRNA 已成功用于微量残留白血病的监测中^[11]. 本研究的胃癌微转移的模型实验结果显示, $\beta 2$ MG mRNA 扩增曲线的 Cp 值与细胞数间有良好的相关性, 尤其是联用 2 类磁珠时相关性更好(表 1). 荧光定量 RT-PCR 在封闭的毛细管中进行, 无需扩增后的产物分析(如: 电泳), 可避免产物对反应的污染; 实验结果通过 Cp 值来反映, 不受循环数的影响.

使用免疫磁珠富集外周血中的肿瘤细胞时, 有可能存在一定数目的血细胞的污染. de Cremoux et al^[7]报道, 大约有 100 个白细胞的污染. 本研究结果显示, 在正常人外周血中混入胃癌细胞后, 用联用磁珠方法检测到的 $\beta 2$ MG mRNA 的 Cp 值明显比相应的单用阳性或阴性磁珠测出的值大(表 1); 涂片镜检也发现阴性筛选后仍可见少数白细胞(图 1). 这说明单用免疫磁珠有白细胞的污染. Ikeguchi et al^[14]以细胞角蛋白 20 mRNA 作为胃癌细胞的分子标志, 发现癌细胞的阳性率为 33.3%. 此结果明显低于本实验单独使用一种磁珠的结果. 提示单独使用一种免疫磁珠会造成白细胞的污染. 因外周血微转移的检测对于肝癌^[15-17]、胃癌^[18]和肠癌^[19-20]等的诊断、判断转移和指导预后等有较大的临床意义, 所以, 本文报道的方法对进一步提高实体瘤血道微转移检测水平可能有较大的应用价值.

4 参考文献

1 Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Funke I, Babic R, Jauch

- KW, Schildberg FW. Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumor cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Nat Med* 1995;1:1035-1039
- 2 Nakamura T, Yasumura T, Hayashi K, Eguchi R, Ide H, Takasaki K, Kasajima T. Immunocytochemical detection of circulating esophageal carcinoma cells by immunomagnetic separation. *Anticancer Res* 2000;20:4739-4744
- 3 Denis MG, Lipart C, Leborgne J, LeHur PA, Galmiche JP, Denis M, Ruud E, Truchaud A, Lustenberger P. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 1997;74:540-544
- 4 Zigeuner RE, Riesenberger R, Pohla H, Hofstetter A, Oberneder R. Immunomagnetic cell enrichment detects more disseminated cancer cells than immunocytochemistry *in vitro*. *J Urol* 2000;164:1834-1837
- 5 Mattsson L, Bondjers G, Wiklund O. Isolation of populations from arterial tissue, using monoclonal antibodies and magnetic microspheres. *Atherosclerosis* 1991;89:25-34
- 6 Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1995;71:278-281
- 7 de Cremoux P, Extra JM, Denis MG, Pierga JY, Bournstyn E, Nos C, Clough KB, Boudou E, Martin EC, Muller A, Pouillart P, Magdelenat H. Detection of MUC1-expressing mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients by real-time polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res* 2000;6:3117-3122
- 8 Soria JC, Gauthier LR, Raymond E, Granotier C, Morat L, Armand JP, Boussin FD, Sabatier L. Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999; 5:971-975
- 9 Iinuma H, Okinaga K, Adachi M, Suda K, Sekine T, Sakagawa K, Baba Y, Tamura J, Kumagai H, Ida A. Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 and K-ras genes in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000; 89:337-344
- 10 Emig M, Saussele S, Wittor H, Weisser A, Reiter A, Willner A, Berger U, Hehlmann R, Cross NC, Hochhaus A. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia* 1999;13:1825-1832
- 11 Degan M, Mazzocco FT, Di Francia R, Rossi FM, Pinto A, Gattei V. Normalizing complementary DNA by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of beta2-microglobulin: molecular monitoring of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9:98-109
- 12 Lupberger J, Kreuzer KA, Baskaynak G, Peters UR, le Coutre P, Schmidt CA. Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Mol Cell Probes* 2002;16:25-30

- 13 Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experiment treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 2000;46:69-81
- 14 Ikeguchi M, Ohro S, Maeda Y, Fukuda K, Yamaguchi K, Shirai H, Kondo A, Tsujitani S, Kaibara N. Detection of cancer cells in the peripheral blood of gastric cancer patients. *Int J Mol Med* 2003;11:217-221
- 15 张开泰, 韩本立, 王玉芝. 肝细胞性肝癌 AFP-mRNA 检测外周血癌细胞的价值. 华人消化杂志 1998;6:689-691
- 16 邬光惠, 陈乃玲, 范公忍, 田惠英, 熊锦华, 黄耀煌. 原发性肝癌患者外周血中甲胎蛋白 mRNA 的意义. 世界华人消化杂志 1999;7:153-155
- 17 刘迎娣, 杨德利, 梁敏, 梁浩, 孙晓华, 程留芳, 汪鸿志. 原发性肝癌患者手术前后外周血 AFPmRNA 测定的意义. 世界华人消化杂志 1999;7:925
- 18 章希炜, 范萍, 杨宏宇, 杨力, 陈国玉. CK20 mRNA RT-PCR 检测诊断胃癌微小转移. 世界华人消化杂志 2002;10:1463-1464
- 19 杨家辉, 饶本强, 王瑶, 涂小煌, 张连阳, 陈少华, 欧阳学农, 戴西湖. 大肠癌患者外周血循环癌细胞检测的临床意义. 世界华人消化杂志 2000;8:187-189
- 20 王志伟, 陈瑞新, 周广军, 沈洪薰, 陈玉泉. 大肠癌患者外周血 CK20 mRNA 的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:818-820

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响

黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇

黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇, 中国人民解放军第 304 医院全军烧伤研究所基础部 北京市 100037

项目负责人: 黎君友, 100037, 北京市海淀区阜成路 51 号, 中国人民解放军第 304 医院全军烧伤研究所基础部. lijunyou2003@yahoo.com.cn

电话: 010-66867395 传真: 010-68429998

收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-07-24

摘要

目的: 从不同角度探讨大鼠肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输等功能的影响, 为更深入地研究肠道损伤及其保护提供防治依据。

方法: 以 Wistar 大鼠肠缺血再灌注(I/R)作模型, 将动物随机分为健康对照(C)、肠系膜上动脉夹闭 1 h(I)、夹闭后再灌 1 h(R 1h)、2 h(R 2h)和 4 h(R 4h)共 5 个组. 分别测血或小肠组织的二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸、D-木糖、肠传输、脂质过氧化物(MDA)和髓过氧化物酶(MPO), 并作小肠普通光镜检查。

结果: R 1h 和 R 4h 组的血浆 DAO 显著升高(R 1h 1.60 ± 0.53 , R 4h 1.58 ± 0.63 vs C 0.94 ± 0.30 , $P < 0.05$), 小肠 DAO 各组有不同程度的降低, R 2h 组降低显著(R 2h 2.52 ± 0.49 vs C 3.59 ± 1.18 , $P < 0.05$), 血浆和小肠 DAO 的变化呈负相关($r = -0.648$, $P < 0.05$). 缺血和再灌注后各时相点血 D-乳酸浓度升高, 其中 R 1h 和 R 2h 升高显著(R 1h 4.63 ± 1.13 , R 2h 3.58 ± 0.57 vs C 2.31 ± 0.89 , $P < 0.05$). 缺血再灌注后肠道 D-木糖的吸收增加, 小肠的传输显著加快。

结论: 肠缺血和再灌注后小肠的屏障、吸收、通透和传输功能均显示不同程度的改变。

黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇. 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(2):464-466

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/464.asp>

0 引言

近 20 a 的研究表明肠道在 MODS 发生发展过程中具有重要作用^[1-6], 为此建立了多种创伤动物模型^[7-10], 旨在探讨其发病机制^[11-17], 其中尤以肠黏膜屏障功能损害及其保护具有重要临床意义^[18-22]. 本研究拟从大鼠肠缺血再灌注模型中, 动态地探讨肠系膜上动脉缺血后再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输等方面功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 ♂ Wistar 大鼠 42 只, 体重 180-240 g, 购自军事医学科学院动物中心. 动物经适应性饲养 1-2 wk 后, 随机分为对照组(C)、肠系膜上动脉夹闭 1 h(I)、夹闭后再灌 1 h(R 1h)、2 h(R 2h)和 4 h(R 4h)5 组, 每组 7-10 只动物, 禁食过夜, 自由饮水. 大鼠腹腔注射 30 g/L 的戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉后, 常规消毒取腹正中切口, 游离肠系膜上动脉(SMA), 以无损动脉夹夹闭 SMA 起始部, 1 h 后松夹恢复 SMA 血流, 即为肠缺血-再灌注模型. 对照组行同样步骤, 但不夹闭 SMA. 全部动物按不同时间点活杀取血和小肠组织制作样品。

1.2 方法 血和小肠组织二胺氧化酶(DAO)测定采用黎君友 et al^[23]稍作方法调整的 DAO 法测定血和小肠组织 DAO 活性; 以 Brandt et al^[24]方法测血浆 D-乳酸含量; 以 Eberts et al^[25-26]方法作适当调整测血浆 D-木糖含量; 以胃内注射葡聚糖蓝(0.5 g/mL)动物活杀后, 取小肠全长, 以 5 g 天平法码垂挂量小肠全长, 然后再量葡聚糖蓝染色长度, 以计算动物小肠传输百分率^[27]. 参考 Koike 和 Mullane 方法^[28-29]作适当修改测定小肠组织髓过氧化物酶活性(MPO). 小肠组织丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量采用 TBA 分光光度法测定^[30]. 光镜下观察小肠组织形态学变化。

统计学处理 数据以均值加减标准差表示(mean±SD),



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

