

(0期)到肝昏迷(IV期)等不同程度类型, MHE为HE广义概念的一部分^[1-2]. HE动物模型的制备方法很多, 适合不同研究目的. 文献报道TAA致鼠急性肝衰竭模型具有良好的重复性和可行性, 已成为目前国内外最成熟和最常用的HE模型, 其中以TAA隔日腹腔内重复注射(2-3次)为公认的制备常规, TAA总量波动于500-1 200 mg/kg, TAA剂量-症状关系也未达成共识^[3].

脑诱发电位(EP)和智力检测为MHE患者的主要诊断手段, 由于动物难行智力检测, 因此EP成为MHE动物模型的惟一识别手段. 鉴于近年动物EP检测技术的广泛应用^[4-5], 建立动物MHE模型及其诊断标准的时机已日渐成熟, 国内外少数学者进行了初步尝试. Albrecht和Hilgier et al学者^[3, 6]提出了MHE模型制备方法, 认为采用TAA(250 mg/kg)隔日ip大鼠2次后停药, 第21 d后即可制成鼠MHE模型, 由于未行EP检测致使动物MHE诊断不明, 仍为MHE假想模型. 2000年, 国内李瑞军 et al^[7]首次把EP检测应用于乳果糖对TAA致免HE/MHE的防治研究, 但较粗略和笼统, 未建立MHE模型和确立动物MHE的诊断标准等.

本文前期研究显示TAA剂量与HE发生率呈正相关, 250 mg组(250 mg/kg隔日ip 2次)的临床HE发生率接近100%, 明显高于200 mg组(200 mg/kg体重隔日ip 2次), 因此, 本文采用小剂量TAA制备鼠MHE模型.

研究显示小剂量TAA(200 mg/kg体重隔日ip 2次)既可显著延长鼠BAEP I波的潜伏期和产生高内毒素血症, 又无临床HE和鼠死亡发生; 若以正常对照组BAEP I波潜伏期均值 ± 1.96 标准差作为MHE诊断标准, 本组SD大鼠的MHE确切发生率为83.3%, 适用于MHE疗效学的定量研究.

4 参考文献

- 1 贾林, 张美华. 肝性脑病的定义、命名、诊断和定量标准修订方案的新进展. 世界华人消化杂志 2003;11:2008-2010
- 2 贾林. 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病. 世界华人消化杂志 2004;12:432-433
- 3 Albrecht J, Hilgier W, Zielinska M, Januszewski S, Hesselink M, Quack G. Extracellular concentrations of taurine, glutamate, and aspartate in the cerebral cortex of rats at the asymptomatic stage of thioacetamide-induced hepatic failure: modulation by ketamine anesthesia. *Neurochem Res* 2000;25: 1497-502
- 4 Shapiro SM. Somatosensory and brainstem auditory evoked potentials in the Gunn rat model of acute bilirubin neurotoxicity. *Pediatr Res* 2002;52:844-849
- 5 Morales-Martinez Jde J, Gonzalez-Pina R, Alfaro-Rodriguez A. Brainstem auditory response in the reserpinized rat. *Proc West Pharmacol Soc* 2002;45:68-70
- 6 Hilgier W, Zielinska M, Borkowska HD, Gadamski R, Walski M, Oja SS, Saransaari P, Albrecht J. Changes in the extracellular profiles of neuroactive amino acids in the rat striatum at the asymptomatic stage of hepatic failure. *J Neurosci Res* 1999; 56:76-84
- 7 李瑞军, 杨昭徐. 乳果糖对临床及亚临床肝性脑病预防作用的实验研究. 胃肠病学 2000;5:214-215

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 •

NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族炎症性肠病的相关性

瞿 艳, 郭秋莎, 夏 冰

瞿艳, 郭秋莎, 夏冰, 武汉大学中南医院综合医疗科 湖北省武汉市 430071
国家自然科学基金资助课题, No. 30370638
项目负责人: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院综合医疗科.
bingxia@public.wh.hb.cn
电话: 027-67812885
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

摘要

目的: 研究我国湖北汉族人NOD2基因3020insC移码突变频率与炎症性肠病(IBD)的相关性.

方法: 采用特异性等位基因PCR方法对74例溃疡性结肠炎(UC)、15例克罗恩病(CD)患者以及172例正常对照者NOD2基因3020insC多态性进行检测.

结果: 正常对照者、UC以及CD患者NOD2基因3020等

位基因频率分别为0.29%、1.35%及3.33%, 均无显著性差异. 但CD对比健康对照组的 $P=11.828$, 95% CI=0.7 205-194.17, 提示NOD2基因3020insC移码突变是CD的危险因素.

结论: NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族CD与UC患者无显著相关性.

瞿艳, 郭秋莎, 夏冰. NOD2基因3020insC移码突变与中国湖北汉族炎症性肠病的相关性. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1208-1210

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1208.asp>

0 引言

炎症性肠病(IBD)包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD)

两种临床类型,其免疫和遗传因素在发病机制中起重要作用.至今,NOD2基因是所发现的CD的第一个易感基因^[1-2].在大多数西方人群已被证实,然而,未被日本和香港人所证实^[3-4].NOD2是参与细胞凋亡调控的NOD1/APAF-1家族的成员,表达于外周血单核细胞和回肠黏膜,通过NF- κ B信号转导通路激活一系列炎性细胞因子的转录与表达,在肠黏膜的炎性损伤中起重要作用^[5].目前,鲜见NOD2基因多态性在中国汉族人群中的分布及与IBD患者相关性的报道.本研究旨在探讨我国湖北汉族人中NOD2基因移码突变的频率及其与IBD的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2001/2003在武汉大学中南医院以及武汉市其他大型综合医院就诊的湖北汉族无亲缘关系的IBD患者89例(74例UC,15例CD)以及健康对照者172例. UC及CD诊断标准参照中华医学会消化病学分会2001“对炎症性肠病诊断治疗规范的建议”^[6].健康对照者来自正常体检者.

1.2 方法 基因组DNA提取:采血5 mL,EDTA抗凝,常规蛋白酶K消化,苯酚-氯仿提取.提取的DNA溶解于TE液中,-25℃保存. NOD2基因3020insC移码突变检测:采用特异性等位基因PCR (allele specific PCR)方法,检测NOD2基因3020insC移码突变.在25 μ L的反应体系中加入特异性引物(表1),引物设计参照文献^[2]. 94℃预变性5 min. 变性94℃,45 s;退火59℃,45 s;延伸72℃,45 s;共35次循环.最后彻底延伸于72℃,7 min. PCR产物于20 g/L琼脂糖电泳,溴乙锭染色,在紫外分析仪下分析鉴定. PCR产生533 bp的非特异性产物及319 bp片段(野生型)和/或214 bp片段(3020insC突变型). 3020insC突变型DNA参考标本由荷兰阿姆斯特丹自由大学惠赠.

表1 NOD2基因3020insC突变特异性等位基因PCR引物

引物	序列
顺式引物	5' -CTGAGCCTTTGTTGATGAGC-3'
反式引物	5' -TCTTCAACCACATCCCCATT-3'
野生型顺式引物	5' -CAGAAGCCCTCCTGCAGGCCCT-3'
3020insC反式引物	5' -CGCGTGTCAATTCCTTCATGGGGC-3'

统计学处理 通过SPSS 11.5软件包,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

对89例IBD患者(74例UC,15例CD)以及172例健康对照者的DNA样本进行检测,发现4例3020insC移码突变杂合子,其中正常对照者1例、UC 2例、CD 1例.正常对照者、UC以及CD患者NOD2基因3020等位基因频率分别为0.29%,1.35%及3.33%,均无显

著性差异(表2).但CD对比健康对照组的 $P = 11.828$,95% CI = 0.7 205-194.17,提示NOD2基因3020insC移码突变是CD的危险因素.

表2 健康对照者、UC和CD患者NOD2基因3020insC突变基因型和等位基因频率

基因型	健康对照者	UC	CD
<i>n</i>	172	74	15
野生型	171	72	14
3020insC突变杂合子	1	2	1
3020insC突变纯合子	0	0	0
3020insC等位基因频率	0.29	1.35	3.33

3 讨论

NOD2基因位于16q12,是近2 a发现的人类CD的第一个易感基因.1996年Hugot et al^[7]通过对IBD患者家系的连锁分析,发现第16条染色体着丝点附近的CD易感位点,称位IBD1.2001年,Hugot et al^[1]在IBD1区域,对含有D16S3136微卫星标记的细菌人造染色体克隆进行测序,发现在该序列上,R702W,G908R,1007fs单核苷酸多态性(分别以SNP8,12,13表示),与CD有显著相关性.在与人类白细胞cDNA库相比后,发现了人类的第一个CD易感基因NOD2,现命名为CARD15基因. NOD2蛋白质是调节细胞凋亡的超家族CED4/APAF1的成员,由1 013个氨基酸组成,包括两个N末端caspase补充区域(N-terminal caspase recruitment domains, CARD),一个核苷酸结合区域(a nucleotide-binding domain, NBD),一个由多个C末端富含亮氨酸的重复组成的区域(multiple C-terminal leucine rich repeats, LRR区域). NOD2在单核细胞表达,在细胞质中对来源于细菌的致病成分起作用. LRR区域具有结合细菌LPS的活性,激活NF- κ B信号通道. NOD2基因LRR区域的3020insC移码突变,使NOD2蛋白LRR区域发生Leu1007Pro氨基酸互换,终止密码子提前,最后33个氨基酸丢失,导致NF- κ B活性减弱.由于NOD2的缺失导致CD患者对细菌产物的先天性免疫反应减弱,从而过度激活特异性继发性免疫反应,导致CD发生^[8]. CD患者小肠黏膜和潘氏细胞可检测到NOD2的表达,支持NOD2与CD相关的结论^[9-10]. Ogura et al^[2]同时发现这三个基因多态性与CD呈显著性相关,以3020insC移码突变与CD的相关性最为密切,而且在功能上证实是CD的易感基因.一些在英国和德国人等的研究^[11]证实NOD2的3020insC移码突变与CD相关,但Yamazaki et al^[3]以及Leong et al^[4]对日本人和中国香港人CD患者、UC患者以及健康对照者的研究,未发现NOD2基因的突变. NOD2的3020insC移码突变在不同人群中频率不同,可能与种族差异有关.

本研究采用特异性等位基因PCR方法,检测中国湖北汉族74例UC、15例CD以及172例正常对照者

NOD2 基因的 3020insC 突变频率, 未发现正常对照组 3020insC 移码突变频率与 UC 及 CD 患者有显著性差异, 提示在中国湖北汉族人中 NOD2 基因 3020insC 移码突变与 UC 及 CD 无显著相关性, 不可能是 CD 的易感基因, 与日本人^[3]及中国香港人^[4]的结果一致. 但 CD 对比健康对照组的 $P=11.828$, 95% CI=0.7 205-194.17, 提示 NOD2 基因 3020insC 移码突变是 CD 的危险因素. 由于本组 CD 患者病例较少, 有待进一步证实.

NOD2 作为所发现的人类第一个 CD 易感基因, 将 CD 的遗传易感性、机体的先天性免疫与细菌作用有机的联系起来, 在治疗 CD 的策略上重视细菌的作用. 目前, 尚未在亚洲人群中发现 NOD2 的基因突变与 CD 之间存在显著相关性的报道, 提示 IBD, 特别是 CD 涉及多基因的遗传模式, 在不同地区和人群具有明显的种族差异性.

4 参考文献

- 1 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O' Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603
- 2 Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-606
- 3 Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y. Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet* 2002;47:469-472
- 4 Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1465-1470
- 5 Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF- κ B. *J Biol Chem* 2001;276:4812-4818
- 6 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001;21:236-239
- 7 Hugot JP, Laurent-puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Groupe d' Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires Digestives, Orholm M, Bonaiti-pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-823
- 8 夏冰, 邓长生, Pena AS. 克罗恩病的第一个易感基因, NOD2 (CARD15). *中华消化杂志* 2002;22:307-308
- 9 Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003;52:840-846
- 10 Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003;125:47-57
- 11 Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeier A, Macpherson AJ, Bridger S, Van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-1928

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 •

高效液相色谱法测定人胃黏膜中 γ - 氨基丁酸和谷氨酸含量

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 李 宁, 刘福坤

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 南京军区南京总医院消化内科 江苏省南京市 210002
李宁, 刘福坤, 南京军区南京总医院普通外科 江苏省南京市 210002
项目负责人: 朱人敏, 210002, 江苏省南京市中山东路 305 号, 南京军区南京总医院消化内科. wangf65@yahoo.com
电话: 025-80861126
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2004-02-01

摘要

目的: 建立一种可同时测定胃黏膜组织微量 γ - 氨基丁酸 (GABA) 和谷氨酸 (Glu) 含量的高效液相色谱法.

方法: 用异硫氰酸苯酯 (PITC) 作衍生剂, 色谱柱为 Pico/Tag® 氨基酸专用柱, 梯度洗脱, 紫外检测波长 254 nm.

结果: GABA 在 0.125-6.25 nmol/mL 范围, Glu 在 0.025-

2.5 μ mol/mL 范围, 线性关系良好; GABA 和 Glu 加样回收率分别为 90.4-104%, 88.1-105.5%; 批内误差分别为 3.56%, 和 1.12%; 批间误差分别 7.47% 和 5.98%.

结论: 本法稳定、灵敏, 可用于胃黏膜组织 GABA 和 Glu 含量的检测.

朱人敏, 秦苏堤, 何小平, 汪芳裕, 李宁, 刘福坤. 高效液相色谱法测定人胃黏膜中 γ - 氨基丁酸和谷氨酸含量. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1210-1213
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1210.asp>

0 引言

γ - 氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 主要来源于三羧酸循环中的谷氨酸 (Glu), 是一种重要的抑制性神经