

# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (Volume 13 Number 14)**



**14/2005**

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 ● 2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (总第142期)

述 评	1645 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究 姚希贤, 崔东来 1650 胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭 丁连安, 黎介寿
胃 癌	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众
肝 癌	1658 Maxizyme对肝癌突变抑癌基因p53的抑制作用 李岩, 林菊生, 孔心涓 1663 肝癌组织中TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 1R II和NF- $\kappa$ B的表达 缪林, 张锁林, 季国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春 1667 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达 吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛 1673 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1mRNA的表达意义 吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛 1679 重组人内皮抑素真核表达载体pCD-sEndo的构建和表达 邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林 1684 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达 丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌
病毒性肝炎	1688 酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库中新基因NS2TP蛋白结合蛋白基因 张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠 1692 抗HBV多聚酶TP区VH抗体体外可抑制HBV复制 于俊岩, 兰林, 王宇明, 丁世涛 1696 黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型 李迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕 1700 丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因NS2TP的克隆化 张黎颖, 成军, 邓红, 刘妍, 王琳
基础研究	1705 苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用 路平, 王永来, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚 1713 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用 刘静冰, 秦叔逵, 李进 1717 消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌的效应 王昌成 1721 $^{103}\text{Pd}$ 诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响 何贵金, 吴荣, 高沁怡, 许书河, 高红, 姜维国, 蒋涛, 戴显伟, 马凯
文献综述	1725 热休克蛋白家族与肝癌的关系 吴顺华, 成军, 郑玉建 1731 HCV的基因型及其变异与肝细胞癌的关系 韩苏夏, 刘正稳, 马瑾璐 1734 移植肝细胞基因调控研究 林勇, 曾欣 1737 三氧化二砷治疗肝癌的分子机制 吴顺华, 成军, 郑玉建 1744 丁酸钠抗肿瘤作用的新进展 崔路佳, 高善玲, 裴风华 1747 聚乙二醇 $\alpha$ -干扰素治疗慢性乙型肝炎的研究进展 周平, 谢仁江 1750 人类免疫缺陷病毒与黏膜免疫 杨贵波, 邵一鸣
研究快报	1760 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立 陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏 1762 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定 王斌, 魏泓 1766 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用 郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周 1768 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达 谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋 1770 巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bj和Ba基因亚型的初步鉴定 温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿 1773 阿霉素对胃癌细胞内游离 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的影响 邢承忠, 路平, 郭晓临, 刘瑾, 徐惠绵, 袁媛 1776 BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正

临床经验	1779 社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响 张玫, 汤哲, 汤欣, 蔡玲, 牛小羽, 孙书春 1781 口服药物致食管溃疡22例 王孟春, 张丽瑶, 钟琳琳 1782 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用 王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜 1785 肠镜检查肠道准备无效率的影响因素 蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜泊 1787 中国人与非洲黑人 <i>H. pylori</i> 相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析 廖常奎, Geojanna GA 1790 大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究 张思奋, 罗湛滨, 吴文江, 何晶, 范小华 1792 幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎53例 阮鹏, 阮浩然 1794 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义 谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民 1797 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例 孙早喜, 孙诚谊
致 谢	1800 致谢世界华人消化杂志编委
封面故事	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众 世界华人消化杂志 2005;13(14):1652-1657 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm</a>
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 <a href="mailto:isgcon2005@yahoo.co.in">isgcon2005@yahoo.co.in</a> <a href="http://www.isgcon2005.com">isgcon2005.com</a>  Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 <a href="http://www.asge.org/education">www.asge.org/education</a>  II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 <a href="mailto:gec@stradini.lv">gec@stradini.lv</a> <a href="http://www.gastroenterologs.lv">www.gastroenterologs.lv</a>  2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 <a href="mailto:c.chase@imedex.com">c.chase@imedex.com</a> <a href="http://www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm">www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm</a>  10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 <a href="mailto:isde@sapmea.asn.au">isde@sapmea.asn.au</a> <a href="http://www.isde.net">www.isde.net</a>

<div>世界华人消化杂志</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>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 2005-07-28 原刊名 新消化病学杂志</div> <div>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</div>	<div>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: <a href="mailto:wcjd@wjgnet.com">wcjd@wjgnet.com</a> <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a> 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</div>	<div>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.</div> <div>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.</div> <div>2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有</div>
--	---	---

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576.00元	1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立

陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏

陈小燕, 温州医学院附属第二医院消化内科 浙江省温州市 325027  
李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院  
消化内科 上海市 200433  
国家自然科学基金资助项目, No. 30270504  
通讯作者: 李兆申, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科. zhsl@81890.net  
电话: 021-25070552 传真: 021-65341735  
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-08

## 摘要

**目的:** 采用健康♂ Sprague-Dwley (SD) 大鼠建立胰腺外分泌功能研究的动物模型。

**方法:** 取体质量 300-350 g SD 大鼠 16 只, 随机分为两组 (对照组 8 只, 实验组 8 只)。麻醉后在大鼠幽门下 5 mm 和十二指肠、空肠交界处分别置直径 2 mm 的塑料管并固定; 从十二指肠乳头 Oddi 括约肌处置直径 0.7 mm 的塑料管。稳定 30 min 后, 每隔 15 min 收集一次胆胰混合液, 测定体积后留取 100  $\mu$ L 胆胰混合液, 用双蒸水稀释以测定蛋白含量, 剩余的胆胰混合液在下一收集时间内灌入十二指肠。收集 4 管基础状态胆胰混合液后, 实验组以 3 mL/h 的速度向十二指肠内灌注 200 g/L 脂肪乳液 2 h, 并收集 8 管胆胰混合液进行体积和蛋白测定。对照组不进行十二指肠灌注。

**结果:** SD 大鼠胰管插管后均有澄清淡黄色胆胰混合液流出。十二指肠灌注 200 g/L 脂肪乳后胆胰混合液体积较基础状态增加 54.17% ( $P < 0.01$ ); 蛋白分泌量较基础状态增加 115.1% ( $P < 0.01$ ), 实验组十二指肠灌注后胰液的蛋白含量和胰液体积均较灌注前升高, 对照组胰液蛋白含量和体积无变化。

**结论:** 本实验成功建立胰腺外分泌功能研究的 SD 大鼠模型, 优点在于可以直接收集胆胰混合液进行各项指标测定, 反映胰腺外分泌功能, 是一个有效、可靠, 重复性好的动物模型。

陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏. 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1760-1762  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1760.asp>

## 0 引言

到目前为止, 国内关于直接测定胰液以研究胰腺外分泌功能的大鼠模型鲜见报道, 1990 年袁葆直 *et al*<sup>[1]</sup> 对胰腺外分泌功能的研究曾经用 Wistar 大鼠胰腺插管收集胰液。以后国内学者多采用大鼠血清葡萄糖、血清淀粉酶、胰腺组织淀粉酶、胰腺腺泡 <sup>3</sup>H-亮氨酸掺入的测定等来间接反映胰腺外分泌功能的改变<sup>[2]</sup>, 但具有局限性。为此, 我们参考文献[3-6], 采用健康♂ Sprague-Dwley (SD) 大鼠建立胰腺外分泌功能研究的动物模型, 这样就可以直接收集大鼠胰液测定胰液的体积、碳酸氢根浓度和

蛋白浓度以直观反映胰腺外分泌功能, 在此基础上可进一步研究胰腺外分泌功能的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 体质量 300-350 g 的健康♂ SD 大鼠 (西普尔-必凯实验动物有限公司) 16 只, 随机分为两组, 对照组 8 只, 实验组 8 只。200 g/L 脂肪乳液购自广东侨光制药有限公司, 直径 2 mm 的塑料管改良自扬州市长城医疗器械厂制造的一次性使用静脉输液针, 恒流泵 HL-2B 购自上海市清浦沪西仪器厂, 一次性使用 intima-II 静脉留置针购自江苏碧迪医疗器械有限公司, 微量进样器购自上海安亭微量进样器厂, BCA 蛋白质检测试剂盒购自 PIERCE 公司。

**1.2 方法** 实验组动物禁食过夜, 实验前 2 h 禁水。以 20 g/L 氯胺酮 (60-80 mg/kg) 腹腔麻醉后固定于恒温金属板上, 维持肛温 37℃。实验过程中每 30 min 追加一次 1/3 麻醉剂量的氯氨酮。用安尔碘消毒腹部皮肤后, 沿腹正中切口开腹, 暴露胃及十二指肠、胰腺, 在幽门下 5 mm 和十二指肠、空肠交界处分别留置直径 2 mm 的塑料管并固定以待十二指肠脂肪乳的灌注, 仔细分离幽门周围结缔组织后结扎幽门, 结扎空肠上段; 暴露胰管, 从十二指肠乳头处顺畅无阻力地插入外径 0.7 mm 的一次性使用 intima-II 静脉留置针, 拔出针芯, 固定留置针导管以收集胰液。动物稳定 30 min 后, 每隔 15 min 收集一次胰液, 测定体积后留取 100  $\mu$ L 胰液用双蒸水稀释以测定蛋白含量, 其余部分胰液在下一收集时段内从幽门下留置管内匀速注入十二指肠。收集 4 管基础状态胰液后开始以恒流泵 HL-2B 按 3 mL/h 的速度向十二指肠内灌注 200 g/L 脂肪乳液 2 h, 并收集 8 管灌注后胰液。对照组除了不进行十二指肠灌注外, 其余处理同实验组。

**1.3 观察指标** (1) 胰液体积测定: 采用微量进样器测定胰液体积 (mL)。(2) 胰液蛋白测定: 采用 BCA 法。操作流程严格按照 BCA 蛋白质检测试剂盒说明书进行。

**统计学处理** 实验数据以 means  $\pm$  SD 表示, 应用 SPSS 11.0 统计软件, 采用 *t* 检验对各组均数进行显著性检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 十二指肠灌注前后大鼠单位时间内胰液分泌体积的改变** 对照组 180 min 内单位时间 (15 min) 分泌的胰液体积无明显变化, 实验组十二指肠内灌注 200 g/L 脂肪乳液 2 h 后单位时间分泌的胰液体积均值较注射前增加 31.6% ( $P < 0.01$ )。对照组和实验组在后 120 min 内胰液的蛋白分

泌量各时间点均值比较,在第105、120、165、180 min有显著性差别( $P<0.05$ ) (图1)。

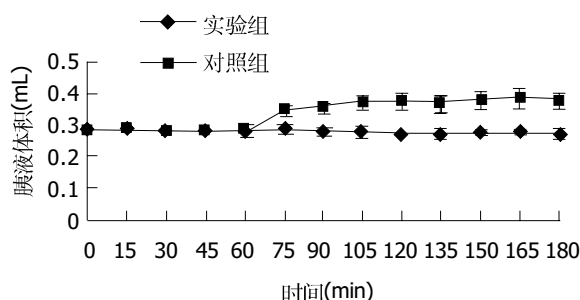


图1 两组大鼠单位时间分泌的胰液体积。

2.2 十二指肠灌注前后大鼠单位时间内胰液蛋白分泌量的改变 单位时间的胰液蛋白分泌量根据单位时间内分泌的胰液体积乘以同时时间段内胰液的蛋白含量计算,以15 min为一个单位.对照组180 min内胰液蛋白分泌量无明显变化,实验组十二指肠内灌注200 g/L脂肪乳液2 h后胰液蛋白分泌量增加115.1% ( $P<0.01$ ).对照组和实验组在后120 min内胰液蛋白分泌量各时间点均值比较均有显著性差别( $P<0.01$ ) (图2)。

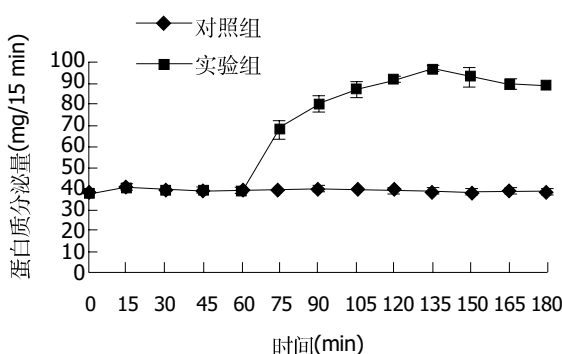


图2 两组大鼠胰液蛋白分泌量。

### 3 讨论

餐后胰腺外分泌是食物消化吸收过程中的重要组成部分,目前认为这一过程主要由内分泌激素胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)及迷走-迷走反射作用于胰腺的迷走神经胆碱能节后神经调节<sup>[7-11]</sup>。但餐后迷走神经信号的上传、中枢整合后控制胰腺分泌信号的下传神经通路及在这一通路中参与的神经递质还未阐明。但是到目前为止,国内关于直接测定胰液以研究胰腺外分泌功能的大鼠模型鲜有报道。因此,有必要建立一个有效、可靠、重复性好的动物模型以进行胰腺外分泌调节机制的进一步研究。

胰腺外分泌的调节分为头相、胃相和肠相。其中肠相是调节胰腺分泌最重要的组成部分。食物进入小肠后,蛋白、脂肪和胃酸通过复杂的网络系统包括激素和神经递质产生局部的肠胰反射进一步刺激胰腺分泌。实验证明<sup>[12]</sup>:在长期应用阿托品以及迷走神经切除者的十二指肠刺激对于

胰腺外分泌的影响较小。由于十二指肠黏膜的迷走神经初级传入纤维含有大量CCK-A及5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)受体,肠道内的刺激,如碳水化合物、高渗盐水及黏膜磨擦等,可导致肠黏膜嗜铬细胞(enterochromaffin cell, EC)释放5-HT,继而作用于迷走传入神经末梢的5-HT<sub>3</sub>受体,引起迷走反射主导的胰腺分泌。本研究建立的动物模型希望能够通过十二指肠灌注营养物质,观察灌注前后收集的腺外分泌功能的改变,从而能够进一步进行胰腺外分泌调控机制的研究。

胰液是无色、无臭的碱性液体, pH约为7.8-8.4,胰液中含有无机物和有机物。在无机成分中,碳酸氢盐的含量很高。胰液中的有机物主要是蛋白,由多种消化酶组成,含量由0.1-10%不等,随分泌的速度不同而有不同。因此,可通过测定单位时间胰液的体积和单位时间蛋白分泌量直接反映胰腺外分泌功能的改变。

本实验建立胰的外分泌功能研究的大鼠模型采用两组动物胰管插管内均有澄清淡黄色胰液流出,直接收集胰液进行各项指标(体积、蛋白酶等)测定,观察胰液外分泌功能的改变,进一步可以进行各种胰腺外分泌功能的基础研究。本模型的优点就在于可以直接收集胰液进行各项指标测定,从而通过测定单位时间胰液的体积、碳酸氢根的浓度和单位时间蛋白分泌量,直接反映胰腺外分泌功能的改变。本模型的建立为小鼠胰腺外分泌功能调节机制的研究打下了基础,是一个有效、可靠,而且重复性很好的动物模型。

### 4 参考文献

- 袁葆直, 周吕. 侧脑室注射神经降压素对大鼠胰腺外分泌的影响. 基础医学与临床 1990;10:24-27
- 杨英魁, 朱文玉. 血糖浓度对糖尿病大鼠胰腺外分泌功能的影响. 生理学报 1994;46:52-58
- Guan D, Phillips WT, Green GM. Pancreatic secretion stimulated by CCK is not mediated by capsaicin-sensitive vagal afferent pathway in awake rats. *Am J Physiol* 1996;270(5 Pt 1):G881-G886
- Li Y, Hao Y, Owyang C. Evidence for autoregulation of cholecystokinin secretion during diversion of bile pancreatic juice in rats. *Gastroenterology* 1995;109:231-238
- Li Y, Wu XY, Zhu JX, Owyang C. Intestinal serotonin acts paracrine substance to mediate pancreatic secretion stimulated by luminal factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G916-G923
- Li JP, Chang TM, Chey WY. Roles of 5-HT receptors in the release and action of secretion on pancreatic secretion in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G595-G602
- Owyang C. Physiological mechanisms of cholecystokinin action on pancreatic secretion. *Am J Physiol* 1996;271(1 Pt 1):G1-G7
- Niebergall-Roth E, Singer MV. Central and peripheral neural control of pancreatic exocrine secretion. *J Physiol Pharmacol* 2001;52(4 Pt 1):523-538
- Li Y, Owyang C. Endogenous cholecystokinin stimulated pancreatic enzyme secretion via a vagal afferent pathway in rats. *Gastroenterology* 1994;107:525-531
- Li Y, Hao Y, Owyang C. High-affinity CCK-A receptors on the vagus nerve mediates CCK-stimulated pancreatic secretion in rats. *Am J Physiol* 1997;273(3 Pt 1):G679-G685
- Li Y, Owyang C. Pancreatic secretion evoked by cholecystokinin and non-cholecystokinin-dependent duodenal stimuli via

vagal afferent fibers in rats. *J Physiol* 1996;491(Pt 3):773-782  
12 Adler G, Beglinger C, Braun U, Reinshagen M, Koop I, Schafmayer A, Rovati L, Arnold R. Interaction of the cholin-

ergic system and cholecystokinin in the regulation of endogenous and exogenous stimulation of pancreatic secretion in humans. *Gastroenterology* 1991;100:537-543

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定

王斌, 魏泓

王斌, 魏泓, 中国人民解放军第三军医大学基础医学部实验动物学教研室  
重庆市 400038

通讯作者: 魏泓, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学基础医学  
部实验动物学教研室. weihong@mail.tmmu.com.cn

电话: 023-68752051 传真: 023-68752051

收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-08

### 摘要

**目的:** 提取和鉴定参与乳杆菌黏附肠上皮样细胞以及粘蛋白受体的细胞壁表面蛋白。

**方法:** 采用 HRP 标记的粘蛋白受体以及 NHS-Biotin 标记的 HT-29 细胞与提取的乳杆菌 JCM1081 的细胞壁表面蛋白进行蛋白印迹, 对参与黏附的细胞壁表面蛋白进行初步鉴定。

**结果:** Western blot 结果显示  $M_r$  29 000 和  $M_r$  14 000 的两种细胞壁表面蛋白在与粘蛋白受体和 HT-29 细胞的杂交中都出现了强阳性。

**结论:** 存在于乳杆菌 JCM1081 细胞壁表面的  $M_r$  29 000 和  $M_r$  14 000 的两种蛋白能够特异性识别粘蛋白受体和细胞膜受体, 并与之结合, 为乳杆菌 JCM1081 的黏附相关蛋白。

王斌, 魏泓. 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1762-1766

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1762.asp>

### 0 引言

乳杆菌是人体肠道内正常的生理性有益菌, 是肠黏膜生物屏障的主要组成部分, 进入肠道内的乳杆菌通过黏附、定植于肠黏膜表面以保护肠黏膜上皮细胞免受各种病原微生物的损伤, 所以乳杆菌在肠道内的黏附、定植是其发挥生理作用的前提和基础. 黏附是细菌与宿主细胞相互作用的第一步, 黏附过程首先是细菌的黏附素与宿主细胞表面的特异性黏附素受体识别, 并与之结合, 其后才引起一系列细胞变化过程. 早在 1985 年, Op den Camp *et al*<sup>[1]</sup>

在研究双歧杆菌黏附时发现, 其细胞壁脂磷壁酸(LTA)与其黏附有关, 提示 LTA 参与了乳杆菌对肠上皮细胞的黏附. LTA 可能先锚定于细菌表面蛋白分子上, 然后通过其脂类部分与宿主细胞表面的纤维连结蛋白结合<sup>[2]</sup>. 随后, 一些学者又先后发现乳杆菌的胞壁表面蛋白以及胞外分泌型蛋白等也与黏附有关<sup>[3-4]</sup>, 而且在有些乳杆菌的外表面, 还发现存在有一层呈单分子晶体排列的 S 层蛋白, 也参与了乳杆菌的黏附<sup>[5-6]</sup>. 但到目前为止, 对其黏附的具体机制以及黏附素蛋白仍缺乏较为深入的研究. 为此本实验通过提取乳杆菌细胞壁表面蛋白, 对其参与黏附的表面蛋白进行了初步研究。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) JCM1081, 购自日本理化研究所微生物保藏中心. 人结肠癌细胞株 HT-29, ATCC 编号 HTB-38, 由西南医院中心实验室惠赠. 胰蛋白酶购自华美生物科技公司, 新生牛血清购自天津 TBD 公司, DMEM 培养基购自 Gibco 公司, 粘蛋白、辣根过氧化物酶 (HRP)、弗氏完全佐剂和不完全佐剂均购自 Sigma 公司, Sulfo-NHS-Biotin 购自 PIERCE 公司, HRP-羊抗兔 IgG 和 DAB 显色试剂盒均购自博士德生物公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 细菌培养** 罗伊氏乳杆菌 JCM1081 在含 100 mL/L 甘油的 MRS 中  $-80^{\circ}\text{C}$  保存, 将以上菌株接种于新鲜配制的 MRS 液体培养基,  $37^{\circ}\text{C}$  培养 24 h。

**1.2.2 细胞培养** 将 HT-29 细胞置于含 100 mL/L 热灭活的新生牛血清和双抗 (青霉素、链霉素浓度各为 10 万 U/L) 的 DMEM 细胞培养液中,  $37^{\circ}\text{C}$ 、100 mL/L  $\text{CO}_2$  的二氧化碳培养箱中孵育, 每天换液一次, 每周传代一次, 15-20 d 后进行实验。

**1.2.3 乳杆菌细胞壁表面蛋白的提取** 采用 Aléijung 和