

# 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://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:wjgd@wjgnet.com">wjgd@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)

## RAPID COMMUNICATION

- 909 Expression of  $\alpha$ -adrenergic receptor (AR),  $\beta_1$ -AR and  $\beta_2$ -AR in liver tissue of nonalcoholic fatty liver disease rats  
*Liu N, Mu H, Zheng JM, Liang CD*
- 915 Exploring relationship between *FOXQ1* gene and colorectal cancer using microarray technology  
*Zheng J, Tang H, Bai X, Yue KL, Guo Q*

## CLINICAL PRACTICE

- 923 Effect of radiotherapy on prognosis of stage I E/II E gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma  
*Zhang TY, Niu SQ, Zhang YJ*
- 928 Clinical significance of expression of miR-638 in gastric carcinoma  
*Huang SL, Ye H, Tang YW, Wu LN, Guo WY, Shen XL, Dong XW, Zhang X*
- 933 Correlations between ultrasonographic and gastroscopic findings of portal hypertension in patients with liver cirrhosis  
*Ma L, Liang TY, Zhang X*
- 938 Vasopressin V2-receptor antagonist tolvaptan for treating cirrhotic patients with hyponatremia and hepatic edema: A systemic review  
*Guo H, Wu LJ, Jin Z, Li XZ, Jin JJ*
- 947 Influence of gastric fluid reinfusion on enteral nutrition support in intensive care unit patients  
*Wang HY, Yan DB, Liu WW, Duan ML*
- 952 Awareness of functional gastrointestinal disorders among primary hospital doctors in Guangxi  
*He WR, Zhang FC, Liang LX, Wu BY, Li RF*
- 957 Clinical and pathologic features of colorectal polyps: Analysis of 313 cases  
*He JY, Hu YH, Hu MC, Hong JW, Zhang J*
- 962 Role of fecal calprotectin in evaluation of disease activity and recurrence of ulcerative colitis  
*Lin ST*
- 967 Application of meticulous nursing care in elderly patients with gastrointestinal tumors  
*Xia HQ, Zhang JF, Shen CF*
- 972 Spectrum of diseases encountered in minimally invasive surgery department  
*Liu CY, Zhang YF*
- 978 Current situation of diagnosis and treatment of anal fistula: Comparison between China and other countries  
*Chen H, Leng Q, Jin HY, Zhang B*

## CASE REPORT

- 983 Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: A case report  
*Xie Q, Wei S, Dong LF, Cai H*

## Contents

*World Chinese Journal of Digestology*  
Volume 24 Number 6 February 28, 2016

### APPENDIX

I – V Instructions to authors  
I Calendar of meetings and events in 2016

### ACKNOWLEDGMENT

I – II Acknowledgments to reviewers for the *World Chinese Journal of Digestology*

### COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, De-Kui Zhang, Professor, Chief Physician, Second Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Lanzhou University, 82 Cuiyingmen, Chengguan District, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

### Indexed/Abstracted by

Chinese Journal Full-text Database, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, and Abstract Journals.

### RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Xiang Li* Review Editor: *Jin-Li Yan, Zhen-Zhen Du* Electronic Editor: *Jin-Li Yan*  
English Language Editor: *Tian-Qi Wang* Editor-in-Charge: *Peng Guo* Proof Editor: *Peng Guo*  
Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

**Founded** on January 15, 1993

**Renamed** on January 25, 1998

**Publication date** February 28, 2016

#### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

#### ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

#### EDITOR-IN-CHIEF

**Ying-Sheng Cheng, Professor**, Department of Radiology, Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

**Shuang-Suo Dang, Professor**, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

**Xue-Liang Jiang, Professor**, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

**Lian-Xin Liu, Professor**, Department of General Surgery, the First Clinical Medical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

**Zhan-Ju Liu, Professor**, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

**Bin Lv, Professor**, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

**Da-Lie Ma, Professor**, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

**Jun-Ping Wang, Professor**, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

**Xiao-Zhong Wang, Professor**, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

**Deng-Fu Yao, Professor**, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

**Zong-Ming Zhang, Professor**, Department of General Surgery, Beijing Electric Power Hospital, Capital Medical University, Beijing 100073, China

#### EDITORIAL OFFICE

Peng Guo, Director  
*World Chinese Journal of Digestology*  
Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China  
Telephone: +86-10-59080035 13901166126  
Fax: +86-10-85381893  
E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

#### PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc  
8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588, USA  
Fax: +1-925-223-8242  
Telephone: +1-925-223-8243  
E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

#### PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China  
Telephone: +86-10-85381892  
Fax: +86-10-85381893

#### PRINT SUBSCRIPTION

RMB 90.67 Yuan for each issue  
RMB 3264 Yuan for one year

#### COPYRIGHT

© 2016 Baishideng Publishing Group Inc. Articles published by this open access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

#### SPECIAL STATEMENT

All articles published in journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, but not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

#### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at [www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp](http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp). If you do not have web access, please contact the editorial office.

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℃ 保存, 将以上菌株接种于新鲜配制的 MRS 液体培养基, 37℃ 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℃、100 mL/L CO<sub>2</sub> 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



Maurilia的方法<sup>[7-8]</sup>. 方法1:将-80℃低温保存的乳杆菌 JCM1081 菌种按 10 mL/L 的比例接种于新鲜配制的 MRS 培养基中, 37℃培养 24 h, 培养至稳定期, 收集菌体离心(6 000 g)15 min, 并用冷的 PBS 缓冲液洗涤细菌 2 次, 最后用 20 mL PBS 重悬菌体. 在重悬液中加入溶菌酶(2 g/L), 37℃温育 1 h. 将上述重悬液离心(12 000 g)15 min, 沉淀菌体用 1 mol/L 氯化锂重悬, 20℃温育 20 h. 离心收集上清(8 000 g, 30 min), 上清液在 0.01 mol/L PBS 中 4℃透析过夜, 收集样品, 冻干后备用. 方法2:将-80℃低温保存的乳杆菌 JCM1081 菌种按 10 mL/L 的比例接种于新鲜配制的 MRS 培养基中, 37℃培养 24 h, 培养至稳定期, 收集菌体离心(6 000 g)15 min, 并用冷的 PBS 缓冲液洗涤细菌 2 次. 然后加入含 30 mmol/L 碳酸铵、1 mmol/L 苯甲基磺酰氨、5 mmol/L EDTA 以及 10 g/L 蔗糖(pH 8.0)溶液重悬菌体, 后加入含 2 000 U 的变溶菌素、20 mg(10 900 kat/mg)溶菌酶的混合裂解液, 37℃共孵育 30-60 min, 通过测定其  $A_{590}$ , 以检测其原生质体的形成率. 将上述菌液以 10 000 g 离心 10 min, 4℃, 上清液在 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液中(pH 7.0)透析过夜, 收集样品贮于-20℃.

1.2.4 粘蛋白的标记 取粘蛋白溶解于 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液中(pH9.5), 配制成 4 g/L 的粘蛋白溶液;将 HRP 8 mg 溶解于 2 mL 蒸馏水中, 配制成 HRP 溶液, 然后加入至 400  $\mu$ L 新鲜配制的 0.1 mol/L 过碘酸钠溶液中, 混合物室温下搅拌 20 min, 然后置于 0.001 mol/L(pH4.4)乙酸盐缓冲液中, 4℃透析过夜;取出透析后的 HRP, 加入 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.5)20  $\mu$ L 调节 pH 至 9.0-9.5;取 1 mL 粘蛋白和 1 mL HRP 溶液混合, 置于室温下混合搅拌 2 h, 然后加入新鲜配制的 4 g/L 的硼氢化钠溶液 100  $\mu$ L 以除去连接反应;混合液置于 0.1 mol/L (pH7.4)的硼酸缓冲液中, 4℃透析过夜, 标记好的粘蛋白等体积加入 800 mL/L 甘油, -20℃保存.

1.2.5 细胞的标记 培养至单层的 HT-29 细胞用胰蛋白酶消化后, 用 PBS (pH8.0)洗涤 3 次, 4℃, 以除去培养基中所含有的其他蛋白. 然后用 PBS (pH8.0)重悬细胞, 调整细胞浓度至  $2 \times 10^6$ /L. 加入标记物 Sulfo-NHS-Biotin (1.0 g/L), 使其在细胞中的浓度为 2 mmol/L(每毫升细胞悬液中加入 200  $\mu$ L 10 mmol/L Biotin). 将细胞置于室温下共孵育 30 min, 然后用 PBS+100 mmol/L 甘氨酸洗涤细胞 3 次, 以抑制和除去未标记的 Biotin.

1.2.6 乳杆菌多克隆抗体的制备 将乳杆菌 JCM1081 菌液用灭菌的 PBS 洗涤 2 次后, 用 PBS 重悬(浓度为  $1-2 \times 10^{11}$  CFU/L)与弗氏完全佐剂等体积混合, 乳化完全后, 选用新西兰兔 4 只, 每组 2 只, 背部皮下和皮内多点注射, 每点注射量 0.2 mL 左右. 第 1 次免疫后, 10-12 d 后进行第 2 次注射, 第 2 次注射采用不完全佐剂, 开始出现 IgG 抗体;第 2 次注射后 4 d, 进行第 3 次注射, 第 2 次与第

3 次注射方式和剂量同第 1 次. 第 3 次注射后 3 d, 耳缘静脉采血 ELISA 检测抗体效价, 如果效价较低可继续进行免疫, 直到出现合适效价的抗体.

1.2.7 罗伊氏乳杆菌 JCM1081 细胞壁表面蛋白的 SDS-PAGE 和 Western Blot 提取的罗伊氏乳杆菌 JCM1081 细胞壁表面蛋白进行 SDS-PAGE, 采用 120 g/L 分离胶和 50 g/L 浓缩胶的不连续浓度梯度, 100 V 恒压 120 min. 电泳完毕后, 一部分胶用考马斯亮蓝 R-250 进行染色, 另一部分胶移至电转膜仪上, 将蛋白电转移至 PVDF 膜上, 然后将 HRP 标记的粘蛋白和 NHS-Biotin 标记的细胞分别与 PVDF 膜上的蛋白置于 37℃、100 mL/L  $\text{CO}_2$  培养箱中杂交孵育 1 h, 洗涤后加入 DAB 显色试剂, 待显色后, 用 TBS 洗涤膜以终止显色, 出现棕色条带表明目的蛋白与黏附素受体结合.

将 HT-29 细胞接入 T75 Flask 中, 加入 DMEM 培养液 6 mL, 置于 37℃、100 mL/L  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育, 待长至单层细胞后, 用灭菌的 PBS (pH7.2)或 0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH5.0, 含 0.01 mol/L NaCl)洗涤 2 次. 加入 12 mL 浓度为 100 mg/L 的 JCM1081 细胞壁表面蛋白液, 37℃温育 1 h, 阴性对照中只加入相应的缓冲液. 然后用上述缓冲液洗涤细胞 3 次. 细胞用 cell rubber pliceman 刮取, 并用缓冲液重悬, 置于 50 mL 的 Falcon tube 中, 再用缓冲液洗涤 1 次, 并转入 1.5 mL Eppendorf 管中. 在装有细胞的 Eppendorf 离心管中加入 1 mL 0.1 mol/L 盐酸-甘氨酸缓冲液(pH3.0)重悬细胞, 进行洗脱, 1 500 r/m 离心 5 min. 上清液加入 0.2 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH8.0)缓冲液. 然后置于 330 g/L 的 PBS 缓冲液中, 4℃透析过夜. 收集样品, 进行 SDS-PAGE, 不连续浓度, 50 g/L 的浓缩胶和 120 g/L 分离胶, 上样后, 稳压 100 V, 120 min 后将蛋白转移至 PVDF 膜上. 用兔抗 JCM1081 的多克隆抗体进行杂交, 洗膜后, 再加入 HRP-羊抗兔的 IgG (1:200)进行共孵育, 最后用适当稀释的 DAB 显色液进行显色. 另一部分样品进行同样的处理, 即进行 SDS-PAGE, 然后用考马斯亮蓝进行染色.

## 2 结果

2.1 乳杆菌 JCM1081 细胞壁表面蛋白与粘蛋白受体结合的 Western blot 采用两种不同的方法对罗伊氏乳杆菌 JCM1081 细胞壁表面蛋白进行了提取, 将提取的细胞壁表面蛋白进行 SDS-PAGE, 从 SDS-PAGE 图谱中可以看出, 利用方法 1 (溶菌酶结合氯化锂方法)提取得到的细胞壁表面蛋白与利用方法 2 (溶菌酶结合变溶菌素的方法)提取得到的细胞壁表面蛋白基本相似, 但在  $M_r$  29 000 和  $M_r$  14 000 的范围内略有差异(图 1). 将上述两种方法提取得到的细胞壁表面蛋白进行 SDS-PAGE, 并将蛋白转移至 PVDF 膜上, 然后与 HRP 标记的粘蛋白受体进行杂交, 结果显示,

细胞壁表面蛋白, 进行 SDS-PAGE 后分别与 HRP 标记的粘蛋白受体和 NHS-Biotin 标记的 HT-29 进行杂交, Western blot 结果显示, 在乳杆菌 JCM1081 细胞壁表面蛋白中,  $M_r$  29 000 和  $M_r$  14 000 的两种蛋白在与粘蛋白和细胞的杂交中都出现了强阳性, 表明这两种蛋白都能够特异性与粘蛋白受体和 HT-29 细胞结合, 提示这两种蛋白可能参与了乳杆菌 JCM1081 与粘蛋白以及细胞的黏附. 尤其对于与细胞的黏附, 由于细胞膜表面分布有细菌黏附素的特异性受体, 我们首次采用 NHS-Biotin 标记 HT-29 细胞, 与电泳分离的乳杆菌细胞壁表面蛋白进行杂交, 鉴定出与细胞膜受体特异性结合的乳杆菌细胞壁表面蛋白. Hayman *et al*<sup>[14]</sup> 曾采用大鼠的肾细胞 (NRK) 与转移到纤维素膜上的血浆中的未知蛋白进行杂交, 成功鉴定出一种新的与细胞黏附有关的血清扩散因子 (SSF), 表明利用这种方法能够灵敏的检测到与细胞黏附的特异性蛋白. 以上结果显示,  $M_r$  29 000 和  $M_r$  14 000 两种蛋白不仅可以和粘蛋白受体特异的结合, 而且还能够与细胞膜受体特异性结合, 表明这两种蛋白为乳杆菌 JCM1081 的黏附相关蛋白.

另外, 我们将提取的乳杆菌 JCM1081 的细胞壁表面蛋白与细胞共孵育后, 利用不同的缓冲液对黏附至细胞表面与膜受体特异性结合的蛋白进行洗脱, 洗脱下来的蛋白进行免疫印迹, 通过乳杆菌 JCM1081 的多克隆抗体对与膜受体特异性结合的乳杆菌细胞壁表面蛋白进行鉴定, 结果显示, 在  $M_r$  29 000 处有条阳性条带, 表明这种  $M_r$  29 000 的蛋白为乳杆菌细胞壁表面蛋白, 能够与细胞膜上的受体特异性结合. 这与 Granato *et al*<sup>[15]</sup> 研究报道的结果不尽一致, Dominique 研究发现分子量为  $M_r$  50 000 的 EF-Tu 是 *Lactobacillus johnsonii* NCC533 的黏附素蛋白, 此黏附素蛋白参与了 *Lactobacillus johnsonii* NCC533 和 HT-29 细胞的黏附过程. 这可能是由于乳杆菌 JCM1081 和约氏乳杆菌 NCC533 属不同的种, 所以参与黏附的蛋白存在很大差异. 但是与前面采用 HRP 标记的粘蛋白和 NHS-Biotin 标记的细胞检测到的黏附素蛋白一致, 只是未出现  $M_r$  14 000 的杂交阳性条带, 这可能是因为采用的抗 JCM1081 的抗体为多克隆抗体,  $M_r$  14 000 的蛋白未出现杂交阳性可能是由于此小分子蛋白免疫原性较低, 或含量较少. 但前面的实验已证实乳杆菌细胞壁表面蛋白中  $M_r$  29 000 和  $M_r$  14 000 这两种蛋白是参与乳杆菌与粘蛋白黏附的外表面黏附相关蛋白, 而且可以和标记的 HT-29 细胞特异性结合, 所以结合以上实验结果, 提示  $M_r$  29 000 和  $M_r$  14 000 蛋白是乳杆菌 JCM1081 的黏附素蛋白, 其不仅参与了乳杆菌与粘蛋白的黏附, 同时也参与乳杆菌与肠上皮样细胞 HT-29 黏附.

Alelijung *et al*<sup>[7]</sup> 在罗伊氏乳杆菌 NCIB11951 中发现了两个与 I 型胶原黏附有关的细菌表面蛋白 Cnb (Collagen binding protein, 胶原结合蛋白), Cnb

蛋白  $M_r$  29 000, 氨基酸序列分析表明含有两个典型的胞外受体连接区的基序. Cnb 基因上游的一个开放阅读框 (ORF) 与 ATP 连接组分有高度同源性, 有别于 S 层蛋白家族. 另一个 Cnb 蛋白  $M_r$  31 000, 与  $M_r$  29 000 的蛋白在抗原性方面有交叉反应, 说明是同一类型相关蛋白, 但其 N-端氨基酸序列同源性较低, 推测这可能是由于  $M_r$  31 000 蛋白由于修饰或降解, 造成了 N-端信号序列的缺失, 由此引起分子量以及 N-端氨基酸序列的不同. Maurilia *et al*<sup>[8]</sup> 研究发现, 在 *Lactobacillus fermentum* 104R 的细胞壁表面存在一种与其黏附有关的蛋白, 称之为粘蛋白黏附促进蛋白 (MAPP), 这种蛋白  $M_r$  29 000, 呈二聚体或多聚体, 以非共价键连接在细菌表面, 在细菌生长进入稳定期后, 这种蛋白便可释放到培养上清中, 此蛋白可介导 *Lactobacillus fermentum* 104R 与猪的小肠黏液以及猪胃粘蛋白的黏附, 其 N-端氨基酸序列与 Cnb 蛋白有一定的相似性. 关于我们鉴定出的  $M_r$  29 000 蛋白是否与 Cnb 和 MAPP 为同一类蛋白, 还有待于蛋白测序后进行深入的比较研究.

#### 4 参考文献

- 1 Op den Camp HJ, Oosterhof A, Veerkamp JH. Interaction of bifidobacteria lipoteichoic acid with human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1985;47:332-334
- 2 Granato D, Perotti F, Masserey I, Rouvet M, Golliard M, Servin A, Brassart D. Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:1071-1077
- 3 Chauviere G, Coconnier MH, Kerneis S, Fourniat J, Servin AL. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J Gen Microbiol* 1992;138 (Pt 8):1689-1696
- 4 Greene, Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of *Lactobacilli* to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:4487-4494
- 5 Schneitz C, Nuotio L, Lounatma K. Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *J Appl Bacteriol* 1992;74:290-299
- 6 Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J App Microbiol* 2003;94:981-987
- 7 Aleljung P, Shen W, Rozalska B, Hellman U, Ljungh A, Wadstrom T. Purification of collagen-binding proteins of *Lactobacillus reuteri* NCIB 11951. *Curr Microbiol* 1994;28:231-236
- 8 Rojas M, Ascencio F, Conway P. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2330-2336
- 9 Sajjan SU, Forstner JF. Characteristics of binding of *Escherichia coli* serotype O157: H7 strain CL-49 to purified intestinal mucin. *Infect Immun* 1990;58:860-867
- 10 Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkko S, Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol* 2001;64:119-126
- 11 Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett* 1998;167:185-189
- 12 Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Lett Appl Microbiol* 1999;28:



- 159-163
- 13 Lorca G, Torino MI, Font de Valdez G, Ljungh A A. *Lactobacilli* express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 206:31-37
- 14 Hayman EG, Engvall E, A'Hearn E, Barnes D, Pierschbacher M, Ruoslahti E. Cell attachment on replicas of SDS polyacry-

- lamide gels reveals two adhesive plasma proteins. *J Cell Biol* 1982;95:20-23
- 15 Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Corthesy-Theulaz IE. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun* 2004;72:2160-2169

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 •

## 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

郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周, 汕头大学医学院第二附属医院消化科 广东省汕头市 515041

通讯作者: 吴灵飞, 515041, 广东省汕头市东厦北路 69 号, 汕头大学医学院第二附属医院消化科. lingfeiwu@21cn.com

电话: 0754-8915810 传真: 0754-8346543

收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-08

### 摘要

**目的:** 研究幽门螺杆菌(*H pylori*)和促胃液素(gastrin, Gas)在胃癌前病变中的作用。

**方法:** 114 例患者分为三组:浅表性胃炎组(CSG,  $n = 49$ )、萎缩性胃炎组(CAG,  $n = 32$ )和胃癌前病变组(GPL,  $n = 33$ ),另设正常对照组 25 人。采用 $^{14}\text{C}$ -呼气试验、Warthin-Starry 染色及血清学抗体方法检测 *H pylori*, 采用放免法检测血清 Gas 水平。

**结果:** 与正常对照组 *H pylori* 感染率相比, 浅表性胃炎、萎缩性胃炎及胃癌前病变组均明显增高(63.2%, 71.9%, 60.6%,  $P < 0.05$ ), CAG 及 GPL 组 *H pylori* 阳性患者中血浆 Gas 水平显著高于正常对照组( $P < 0.05$ )。

**结论:** *H pylori* 与促胃液素在胃癌前病变中具有一定作用。

郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周. 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1766-1768

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1766.asp>

### 0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是人类最常见的一种致病菌,是慢性胃炎及十二指肠溃疡的主要致病因子,与胃癌的发生亦有关<sup>[1-2]</sup>。人群中有较高 *H pylori* 感染率,但仅少部分人出现症状,原因尚不清楚。有人报道促胃液素(Gas)与胃癌的发生有关<sup>[3]</sup>,本文进行相关研究,以探讨他们在胃癌前病变中的作用。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集我院 2001-01/2004-12 临床病例 114 例,均经胃镜下活检并由病理诊断,其中慢性浅表性胃炎(CSG) 49 例,慢性萎缩性胃炎(CAG) 32 例,胃癌前病变(GPL,包括肠上皮化生和/或不典型增生) 33 例,其中男 65 例,女 49 例,平均年龄  $41 \pm 21$  岁。另设正常对照组 25 人,男 17 例,女 8 例,平均年龄  $35 \pm 15$  岁,胃镜检查阴性,二组年龄无显著性差异。Gas 试剂盒购自北方生物技术研究所。

#### 1.2 方法

**1.2.1 内镜及病理诊断** 参照全国慢性胃炎研讨会共识意见<sup>[4]</sup>,分别按部位(胃窦、胃体部)各取活检组织行 HE 染色及病理学检查。慢性炎症以淋巴细胞及浆细胞浸润为特征,活动性炎症则以中性粒细胞浸润为指标。上皮及固有膜内无中性粒细胞浸润为正常;固有腺体减少为萎缩。在萎缩基础上由肠化腺体替代正常腺体诊断为化生,出现腺体或上皮细胞排列结构紊乱、极性消失、胞核增大为不典型增生,肠上皮化生或不典型增生均归入癌前病变。

**1.2.2 *H pylori* 检测** 采用 Warthin-Starry 银染色法、血清学抗体方法、 $^{14}\text{C}$ -尿素呼气试验或活检组织快速尿素酶试验。如果 2 项试验阳性则诊断 *H pylori* 感染。

**1.2.3 Gas 测定** 所有病例均于清晨空腹静脉采血,按照说明书以放射免疫法测定 Gas 含量。

**统计学处理** 计量资料采用  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示,均数的检验采用  $t$  检验。计数资料采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 不同病变组织中 *H pylori* 感染情况** 49 例 CSG 中, *H pylori* 阳性 31 例, *H pylori* 阴性 18 例, *H pylori*