

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 $P=11.828$, $95\% \text{ CI}=0.7 \text{ 205-194.17}$, 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

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Hugot JP, Laurent-puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie 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
- 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
- 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
- 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
- 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

递质,广泛存在于脊椎动物脑内,外周组织中含量很低^[1-3]。近年来研究表明:GABA除了作为胃肠神经递质,还有可能作为一种胃肠激素^[4],协同Glu,参与胃肠黏膜细胞分裂、分化、成熟的调节^[5],抑制胃癌的发生^[4]。随着GABA、Glu与胃癌关系研究的不断深入,要求建立一种快速、精确定量胃黏膜组织GABA、Glu含量的方法。

国外已有文献报道,应用荧光分光光度法测定人胃黏膜组织GABA含量,但灵敏度较低,干扰因素较多^[5]。本文首次采用异硫氰酸苯酯(PITC)柱前衍生,高效液相色谱(HPLC)-紫外检测法测定胃黏膜组织GABA、Glu含量。国内外未见此类报道。该法的优点是PITC与氨基酸反应生成能在254 nm下检测的PITC-氨基酸^[6-11],分析速度快,灵敏度高,结果令人满意。

1 材料和方法

1.1 材料

Waters 高效液相色谱仪系统(美国 Waters 公司),其中包括 510 泵两台,486 紫外检测器,自动梯度控制器,控温仪及柱温箱;Pico/Tag™ 工作台;7 725 i 进样阀(美国 Rheodyne 公司);色谱工作站(杭州英谱公司)。γ-氨基丁酸和谷氨酸:美国 Sigma 公司;衍生剂异硫氰酸苯酯(PITC):美国 Pierce 公司;乙腈、甲醇均为色谱纯:德国 Merck 公司;乙酸钠为分析纯:英国普尔 BDH 化学公司;其余试剂均为市售分析纯试剂,水为重蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Pico/Tag® 氨基酸专用柱, 3.9 mm × 300 mm; 流动相: 流动相 A 为乙腈: 70 mmol/L⁻¹ 醋酸缓冲液(pH 6.5) = 25: 975, 含 0.25 mL/L⁻¹ 的 10 mmol/L⁻¹ EDTA; 流动相 B 为乙腈: 水: 甲醇 = 450: 400: 150。梯度洗脱条件如表 1。紫外检测波长 254 nm; 柱温 45 °C; 进样量 20 μL。

表 1 梯度洗脱程序表

时间(min)	流动相(mL/min ⁻¹)	A%	B%	曲线
起始	1.00	100	0	-
13.50	1.00	97	3	11
20.00	1.00	96	4	8
20.50	1.00	20	80	5
22.50	1.00	0	100	6
23.00	1.00	100	0	6
30.00	1.00	100	0	6

1.2.2 溶液配制

样品稀释液: 5 μmol/L⁻¹ 的 Na₂HPO₄ 缓冲溶液, pH 7.4。样品干燥液: 甲醇: 1.0 mol/L⁻¹ 醋酸钠: 三乙胺 = 2/2/1(v/v/v)。衍生化试剂: 异硫氰酸苯酯(PITC): 甲醇: 乙醇: 三乙胺: 水 = 1/6/1/1/1 (v/v/v/v); 需新鲜配制。

1.2.3 标本收集及样品前处理

于手术当天取胃癌组织标本(约 100 mg), 同时取距癌组织边缘 5 cm 以上的胃

黏膜组织作为对照, 并经病理证实为癌组织和正常组织, 迅速放入液氮中冷冻, 再转移至 -70 °C 冰箱保存至测定。测定时, 称取 100 mg 左右的胃黏膜组织置小研钵中, 倒入液氮, 待组织冷却坚硬后进行研磨, 粉碎后再加入液氮研磨, 如此反复 3 次, 使组织完全粉碎。加入 400 μL 的样品稀释液将粉碎的组织完全转移到离心管中, 1 000 r/min, 4 °C 离心 5 min, 上清液转移到超滤管中, 1 000 r/min, 4 °C 离心 30 min。

1.2.4 样品衍生化

取超滤液 20 μL 注入 0.5 cm × 5 cm 的玻璃试管中, 冷冻干燥, 然后加入干燥液 10 μL, 再一次冻干, 再加入 20 μL 衍生化试剂, 室温衍生 20 min 后经冻干置冰箱 4 °C 保存。50 μL 样品稀释液复溶, 10 μL 或 20 μL 进样。

2 结果

2.1 色谱行为

图 1 为 Glu 与 GABA 标准色谱图, 各自的保留时间分别为 Glu = 3.98 min, GABA = 16.7 min。图 2 为样品色谱图, 从色谱图可知, 该方法能很好的分离 Glu 与 GABA。

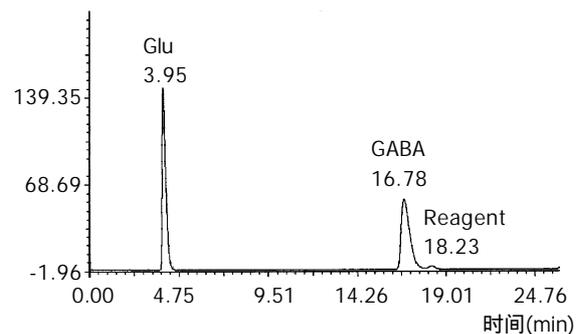


图 1 标准品色谱图。

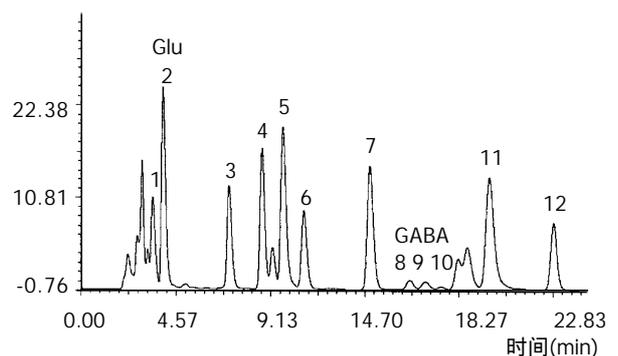


图 2 样品色谱图。

2.2 标准曲线

分别精密配制 Glu 和 GABA 标准溶液, 使其含量为 Glu: 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5 μmol/mL⁻¹; GABA: 0.125, 0.25, 0.625, 1.25, 2.5, 6.25 nmol/mL⁻¹。按照样品衍生步骤衍生并 HPLC 测定, 以峰面积对质量浓度作线性回归, 其线性方程为: Glu $Y=1.58 \times 10^6 C + 18027$, 相关系数 0.9998; 最小检测浓度 2.5 nmol/mL⁻¹。GABA $Y=3\ 723.3C - 547.8$, 相关系数 0.9988; 最小检测浓度 0.01 nmol/mL⁻¹。

2.3 回收率

在混合样品超滤液中加入 Glu 和 GABA 标

准溶液,用加样回收方法考察方法的准确度。 γ -氨基丁酸和谷氨酸加样回收率分别为95.4%,93.5%(表2)。

表2 方法回收率(mean \pm SD)

	样品测定值	加入量	测定值	回收率(%)
GABA (nmol/mL ⁻¹)	0.318 \pm 0.013	0.5	0.852 \pm 0.014	106.8 \pm 3.0
		0.75	1.057 \pm 0.082	95.3 \pm 5.3
Glu (μ mol/mL ⁻¹)	0.310 \pm 0.005	0.5	0.837 \pm 0.049	105.5 \pm 13.1
		1	1.234 \pm 0.036	92.5 \pm 4.4
		5	4.825 \pm 0.134	92.1 \pm 1.4

2.4 精密度 同时取某一样品超滤液三份,按衍生化法处理测定,GABA和Glu的批内误差分别为3.56%,1.12%。不同日取样三次,如上处理求得GABA和Glu的批间误差分别7.47%,5.98%。

2.5 临床应用 用该法测定了30例胃癌手术患者癌组织和正常组织的GABA和Glu含量,胃癌组织GABA和Glu含量显著高于正常组织($P < 0.05$,表3)。这一现象值得引起临床重视,可以为胃癌的临床诊断和治疗提供参考。

表3 胃癌组织与正常胃黏膜组织GABA和Glu含量(mean \pm SD, $n = 30$)

氨基酸	癌组织	正常组织	t	P
GABA(nmol/g ⁻¹)	0.832 \pm 0.576	0.362 \pm 0.417	3.29	<0.05
Glu(μ mol/g ⁻¹)	1.324 \pm 0.596	0.907 \pm 0.342	2.90	<0.05

3 讨论

GABA、Glu在胃黏膜组织含量极低,不具有紫外吸收,也不发射荧光,因此需将他们转变为能被检测的高灵敏度衍生化产物^[6-11]。本文用PITC作衍生剂与胃黏膜组织中的氨基酸反应,衍生物经HPLC分离后紫外检测,建立了一种更简便、更灵敏的方法,适于检测胃黏膜组织的微量GABA、Glu。

本法的优点:(1)组织样品处理时,采用液氮冷冻碾磨法碾碎胃黏膜组织,该法比电动匀浆或超声匀浆法使组织粉碎更加完全,而且简单易行;易于推广。(2)组织衍生前,采用超滤法去除蛋白,不但去除完全,回收率高,样品也没有被稀释,对于含量极低的氨基酸分析是一个非常有效的手段,但美中不足的是成本较高,需要超速冷冻离心机。(3)组织衍生时,采用PITC作为氨基酸衍生剂,具有稳定,不会产生水解反应,也不会形成多级衍生物的优点^[6-11],但有时过量试剂会产生干扰。本法除了采用在衍生化后真空干燥除去过量试剂外,还通过调节流动相梯度,使试剂峰与样品峰分离完全。(4)色谱分析时,采用Pico/Tag[®]氨基酸专用柱,他是Waters公司的专利产品,可非常好的分离PTC-氨基酸,可同时分析18种常用氨基酸,但有报道柱寿命短,最多能分析150个PITC样品。在我们实际工作中采用前

处理干燥完全,乙腈冲洗再生方法,实际分析样品可达到约500个。(5)实际操作时,采用40.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C柱温,提高柱温能缩短保留时间,降低柱压,但过高的柱温会减少分离度,使 γ -氨基丁酸与在其后出现的瓜氨酸以及衍生剂峰重合,因此使柱温保持在40.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C为最佳。

生物样品中微量氨基酸的测定在医学领域中占重要地位,经典的氨基酸分离方法是离子交换色谱法,此法需特殊装置,且分析时间较长,而荧光分光光度法和氨基酸自动分析仪检测,灵敏度较低,干扰因素较多。测定GABA和Glu的高效液相色谱方法,多为用邻苯二甲醛在催化剂作用下与氨基酸发生衍生化反应,衍生物经HPLC分离,电化学检测或荧光检测器检测,并且分析对象为含量较高的脑组织和血清^[12-15]。本文采用PITC为柱前衍生剂,配合紫外检测仪,建立了一种高效、稳定、简便、快捷的HPLC梯度洗脱方法。该法条件简便、灵敏度高,分离周期短,适于检测胃黏膜组织中微量的GABA、Glu,应用前景广泛。

4 参考文献

- Hinoi E, Takarada T, Ueshima T, Tsuchihashi Y, Yoneda Y. Glutamate signaling in peripheral tissues. *Eur J Biochem* 2004; 271:1-13
- Watanabe M, Maemura K, Kanbara K, Tamayama T, Hayasaki H. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *Int Rev Cytol* 2002;213:1-47
- Kuroda E, Watanabe M, Tamayama T, Shimada M. Autoradiographic distribution of radioactivity from (14)C-GABA in the mouse. *Microsc Res Tech* 2000;48:116-126
- Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Nakaizumi A, Ichii M, Taniguchi H. Inhibition by gamma-amino-n-butyric acid and baclofen of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. *Cancer Res* 1990;50:4931-4934
- Matuszek M, Jesipowicz M, Kleinrok Z. GABA content and GAD activity in gastric cancer. *Med Sci Monit* 2001;7:377-381
- Rubio LA. Determination of diaminopimelic acid in rat feces by high-performance liquid chromatography using the Pico Tag method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;784:125-129
- Komarova NV, Kamantsev JS, Solomonova AP, Anufrieva RM. Determination of amino acids in fodders and raw materials using capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;800:135-143
- Dale Y, Mackey V, Mushi R, Nyanda A, Maleque M, Ike J. Simultaneous measurement of phenylalanine and tyrosine in phenylketonuric plasma and dried blood by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;788:1-8
- Yang J, Sun LG, Bai XZ, Zhou HT. Simultaneous determination of 18 amino acids by reversed-phase high performance liquid chromatography with precolumn phenylisothiocyanate derivatization. *Se Pu* 2002;20:369-371
- Woo KL, Hwang QC, Kim HS. Determination of amino acids in the foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a new precolumn derivative, butylthiocarbonyl amino acid, compared to the conventional phenylthiocarbonyl derivatives and ion-exchange chromatography. *J Chromatogr A* 1996;740:31-40
- Brennan JM, O' Dwyer PJ, Ozols RF, LaCreta FP. High-performance liquid chromatographic determination of the S- and R-diastereoisomers of L-buthionine (SR)-sulfoximine in human plasma and urine. *J Chromatogr* 1993;620:121-128

- 12 Rowley HL, Martin KF, Marsden CA. Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde-sulphite derivatisation. *J Neurosci Methods* 1995;57:93-99
- 13 Smith S, Sharp T. Measurement of GABA in rat brain microdialysates using o-phthalaldehyde-sulphite derivatization and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr* 1994;652:228-233
- 14 Naini AB, Vontzalidou E, Cote LJ. Isocratic HPLC assay with electrochemical detection of free gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1993;39:247-250
- 15 Bourdelais A, Kalivas PW. High sensitivity HPLC assay for GABA in brain dialysis studies. *J Neurosci Methods* 1991;39:115-121

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 •

细胞凋亡蛋白在肝癌发生过程中的作用

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平, 中国人民解放军空军总医院消化内科北京市 100036
项目负责人: 白莉, 100036, 北京市海淀区阜成路 30 号, 中国人民解放军空军总医院. bai_li@hotmail.com
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-02-01

摘要

目的: 进一步探讨促凋亡蛋白 Bid 在肝癌发生、发展过程中的作用。

方法: 应用基因毒性化学剂二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)制备肝癌动物模型, 通过阻断肝细胞凋亡信号传导途径, 观察肝癌发生过程中肝细胞的增生指数(BrdU LI)与凋亡比率(AI)及与肿瘤发生的关系。

结果: (1)在 DEN 用药后的第 3 d 和第 10 d, 野生型小鼠肝细胞 BrdU 标记指数和凋亡细胞百分比分别明显高于 Bid 缺陷小鼠($P < 0.05$)。 (2)在 DEN 用药后的第 4 mo, 野生型小鼠肝内损伤性结节的数量和表面积明显多于 Bid 缺陷小鼠, 二者间具有统计学意义($P < 0.001$)。

结论: Bid 缺陷小鼠对 DEN 诱导的肝癌具有明显的抵抗作用, 这一作用可能与早期肝细胞凋亡有关。

白莉, 曹传平, 张映辉, 毛高平. 细胞凋亡蛋白在肝癌发生过程中的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1213-1215

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1213.asp>

0 引言

细胞增生和凋亡之间的不平衡是肿瘤发生最根本的原因. 细胞对任何包括化学、物理和生物有害刺激的反应是通过自身修复、死亡、再增生等方式使机体恢复自身平衡, 细胞在损伤修复过程中的错义修复导致基因的突变使细胞获得了异常增生能力, 便发生了肿瘤. 实际上, 肿瘤组织内细胞增生和凋亡比率均较正常状态的组织有明显增加, 而增生比率高于凋亡. Bid 是 Bcl-

2 家族成员中一个促凋亡蛋白, 通过死亡受体激活细胞凋亡, 尤其是肝细胞的凋亡过程. 我们应用化学致癌模型和 Bid 缺陷小鼠研究细胞凋亡在肝癌发生的早期作用, 设想是早期凋亡刺激细胞增生, 发生基因变异的细胞较正常细胞具有明显的增生优势, 通过比较野生型和 Bid 缺陷鼠对 DEN 诱导致癌损伤的反应和观察细胞增生和凋亡的比率进一步探讨肝癌发生的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ C57BL/6 小鼠, 野生型和 Bid 缺陷型各 14 只 (由美国匹斯堡大学病理系荫博士提供), 分别分为 DEN 组和对照组. DEN 组小鼠出生后第 14 d 腹腔内注射 DEN 15 $\mu\text{g/g}$, 对照组注射同体积的生理盐水, 饲养 3、10 d 和 4 及 8 mo 分别杀鼠, 在杀鼠前 2 h 腹腔注射 30 mg/kg BrdU (Sigma, 美国), 收集肝组织标本分别放置液氮中或制备石蜡切片。

1.2 方法

1.2.1 肝细胞凋亡和增生的检测 采用 TUNEL 试剂盒 (Roche, 美国) 检测肝细胞的凋亡, 操作按照说明. 细胞增生的检测应用抗 BrdU 单克隆抗体 (Dako 公司, 美国) 进行免疫组化染色。

1.2.2 特殊酶学染色 葡萄糖-6-磷酸酶 (G-6-Pase) 染色: 冰冻肝组织切片戊二醛固定后用 2 g/L 硝酸银和 0.53 g/L G-6-Pase 共同孵育 45 min, 然后用 75 g/L 硫酸铵孵育 2 min, 水洗后用戊二醛和冰醋酸按一定比例混合固定, HE 染色封片. GST-pi 染色: 采用兔抗鼠 GST-pi 多克隆抗体 (StressGen, 美国) 进行免疫组化染色。

1.2.3 肝细胞损伤结节或肝肿瘤 HE 染色的肝组织切片在显微镜下观察和计数肝损伤或肝肿瘤结节的数量, 应用 SPOT 软件计量结节的面积, 求结节面积与全肝面积的比值。

统计学处理 细胞增生及凋亡指数和肝损伤结节的数量及平均面积采用 Student t 检验, P 值小于 0.05 为