

- Gastroenterology* 2000;118:36-47
- 7 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 陈刚, 滕小春, 何俊堂. 胃癌及胃癌前病变中幽门螺杆菌感染和 PCNA、p53、Bcl-2 的表达. 重庆医学 2003;32:1135-1137
- 8 Savarino V, Celle G, Vigneri S. *Helicobacter pylori* and acid secretion. *Gastroenterology* 1998;115:510-511
- 9 吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 张金池, 曾哲. 食管反流病与幽门螺杆菌相关胃炎及胃肠激素的关系. 世界华人消化杂志 2004;12:1100-1103
- 10 吴灵飞, 王炳周, 冯家琳, 郑宗茂, 李国平, 张金池. 根除幽门螺杆菌对消化性溃疡合并胃炎及胃泌素的影响. 临床消化病杂志 2004;16:250-252
- 11 Aly A, Shulkes A, Baldwin GS. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704:1-10

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 ·

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

谭永港, 舒晴, 张永锋, 深圳市第二人民医院消化内科
广东省深圳市 518035
邱猛进, 深圳市龙岗区中心医院内科 广东省深圳市 518116
深圳市科技局项目, No. 200405112
通讯作者: 谭永港, 518035, 广东省深圳市笋岗西路 3002 号, 深圳市第二人民医院消化内科.
电话: 0755-3808552 传真: 0755-83228956
收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-14

摘要

目的: 探讨人胃溃疡愈合过程中表皮生长因子(EGF)含量及表皮生长因子受体(EGFR)表达的变化及其作用。

方法: 采用放免及免疫组化方法, 对正常胃黏膜(10例)、胃溃疡活动期(GA组, 20例)、愈合期(GH组, 20例)、瘢痕期(GS组, 20例)胃液 EGF 含量及胃黏膜组织 EGFR 的表达进行测定及定位观察和图像分析。

结果: 正常胃黏膜和 GA 组的胃液 EGF 的含量分别为 502.6 ± 51.3 、 156.2 ± 46.7 ng/L, 经统计学处理差异有显著性意义($P < 0.05$); GH 和 GS 组胃液的 EGF 含量分别为 386.1 ± 76.8 、 466.3 ± 95.4 ng/L, 与 GA 组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$). GA 组胃黏膜 EGFR 的表达均较正常时增加, GH 及 GS 组更加明显; GA 组 EGFR mRNA 表达阳性密度(18.27 ± 3.95)较正常组(8.52 ± 1.18)增高($P < 0.01$), 而 GH 组(24.61 ± 4.98)和 GS 组(27.92 ± 5.44)又较 GA 组明显增高($P < 0.05$).

结论: 人胃溃疡愈合过程中, 胃液 EGF 与溃疡的发生和愈合有关, 胃黏膜 EGFR 的表达由弱到强。

谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋. 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. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1768-1770
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1768.asp>

0 引言

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)具

有广泛的生物学作用, 主要有促进表皮生长, 增强正常细胞的再生能力及损伤修复作用^[1]; 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)主要分布在胃壁、十二指肠和小肠黏膜, 位于上皮的基底部. 近年的研究认为, 在导致溃疡发病的诸因素中, 可能涉及 EGF 的分泌及 EGFR 表达低下^[2]. 我们采用放免及免疫组化方法, 对 EGF 及 EGFR 在正常胃黏膜、胃溃疡活动期、愈合期和瘢痕期的含量及表达情况进行了检测, 以探讨 EGF 及 EGFR 在胃溃疡愈合中的变化及作用。

1 材料和方法

1.1 材料 胃溃疡患者均经内镜证实, 排除药物性溃疡、应激性溃疡或其他慢性病所致的溃疡患者. 胃溃疡分期采用日本学者崎田隆夫倡导的分期法, 将溃疡分为活动期(active stage)、愈合期期(healing stage)和瘢痕期(scarring stage). 选择其中活动期(GA组)、愈合期(GH组)和瘢痕期(GS组)患者各20例, 取胃液及胃黏膜标本, 另取10例正常胃黏膜的胃液及胃窦黏膜组织作对照。

1.2 方法

1.2.1 胃液的收集 上午内镜检查前禁食 12 h, 禁用消泡剂, 经内镜活孔以聚乙烯塑料管抽吸胃液约 2-3 mL, 置入试管中, 立即煮沸 5-10 min, -20℃ 保存待测. 胃黏膜组织均取自溃疡边缘, 标本迅速浸入 16 g/L 多聚甲醛(以 0.1 mol/L PBS 配制, 含 1 mL/L DEPC, pH 为 7.4)中固定 16 h, 脱水, 常规石蜡包埋, 制备 5 μm 厚连续切片. SABC 试剂盒、EGFR 免疫组化试剂盒及 EGFR 原位杂交试剂盒均为武汉博士德生物工程公司产品, 原位杂交专用盖玻片、DEPC 和多聚赖氨酸均为美国 Sigma 公司产品。

1.2.2 EGF含量的测定 按试剂盒说明操作:在平行双管中依次加入胃液0.1 mL, 125I-EGF 0.1 mL(内含放射性800 cpm左右)及EGF抗血清0.3 mL, 总体积为0.5 mL. 同时作标准曲线(测定范围为5-4 000 ng/L). 反应液经充分混匀后于4℃下放置48 h, 然后加入二抗及分离剂, 室温放置30 min, 离心(3 000 r/min, 15 min), 去上清, 沉淀以 γ -计数器读取cpm数. 计数B/B0, 在半对数纸上作出标准曲线并相应读出各管的EGF含量.

1.2.3 EGFR蛋白质检测 (1)切片常规脱蜡至水;(2)30 mL/L H₂O₂处理30 min以灭活内源性过氧化物酶;(3)复合消化液消化10 min;(4)正常山羊血清封闭20 min;(5)兔抗EGFR抗体37℃孵育60 min;(6)生物素化山羊抗兔IgG 37℃孵育20 min;(7)SABC 37℃孵育20 min;(8)DAB显色;(9)苏木素复染. 分别以PBS和正常兔血清替代一抗作为阴性对照.

1.2.4 原位杂交法检测EGFRmRNA的表达 (1)所用玻片经清洗、200℃干5 h、2 mL/L 氨丙基三乙氧基硅烷/丙酮液硅化、多聚赖氨酸包被处理. 切片充分脱蜡至水, 30 mL/L H₂O₂处理30 min, 双蒸水洗2 min×3次, 胃蛋白酶消化以暴露mRNA片段, 0.5 mol/L PBS洗5 min×3次, 双蒸水洗2 min×1次. (2)预杂交和杂交:加预杂交液(含50 g/L 甲酰胺、0.2 g/L 十二烷基硫酸钠、300 mg/L 鲑鱼精DNA、10 g/L 牛血清白蛋白、2×SSC)于40℃预杂交2 h, 加20 μL 含地高辛标记探针的杂交液, 盖上原位杂交专用盖玻片, 40℃杂交过夜. 30℃的2×SSC洗涤5 min, 共3次, 37℃的2×SSC洗涤5 min, 共3次. (3)抗原抗体反应与显色反应:50 g/L 牛血清白蛋白封闭20 min;兔抗地高辛抗体37℃孵育60 min, 0.5 mol/L PBS洗2 min×3次;生物素化羊抗兔IgG 37℃孵育30 min, 0.5 mol/L PBS洗2 min×3次;SABC 37℃孵育30 min, 0.5 mol/L PBS洗5 min×4次;DAB显色;苏木素轻度复染. 以不含探针的杂交液替代EGFR寡核苷酸探针杂交液作为阴性对照. 结果用计算机图像分析系统进行形态计量分析.

1.2.5 形态计量分析 光学显微镜下观察显色反应, 阳性细胞胞质着色均呈棕黄色. 用高分辨摄像机摄像, 经计算机处理, 应用图像分析专用软件, 测定出阳性反应细胞密度(简称阳性密度), 每例从溃疡边缘至移行区随机测试5个以上高倍视野(×400), 计算出每个视野阳性密度的均值.

统计学处理 结果以mean±SD表示, 多组间比较用方差分析和 q 检验, 组内前后比较用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结果

2.1 正常胃黏膜的胃液EGF的含量为502.6±51.3 ng/L, GA组胃液EGF含量为156.2±46.7 ng/L, 经统计学处理差异有显著性意义($P<0.05$);而GH和GS组胃液的EGF

含量分别为386.1±76.8 ng/L、466.3±95.4 ng/L, 与GA组比较, 差异有显著性意义($P<0.05$). 表明胃溃疡患者胃液EGF含量明显降低, 当溃疡愈合时, 其胃液EGF含量亦明显增高, EGF与溃疡愈合、黏膜组织修复密切相关.

2.2 EGFR蛋白质的表达 免疫组织化学染色显示, EGFR表达于黏膜层, 正常胃黏膜可见有少量阳性信号, 主要位于增殖区的颈黏液细胞和一些壁细胞. 在颈黏液细胞, EGFR定位于细胞顶膜表面, 有时在腺腔中有阳性信号, 此时常位于颈细胞相邻的黏液中;而在壁细胞, 阳性信号则散布于整个细胞胞质. 有的表达于浆膜上. GA组溃疡周边及移行区黏膜阳性信号明显增多, GH组和GS组溃疡周边及移行区黏膜阳性信号较GA组显著增强, GS组更加明显.

2.3 EGFRmRNA的表达 原位杂交技术显示, 阳性细胞胞质着色呈棕黄色, 正常胃黏膜可见少量较弱EGFRmRNA阳性信号, GA组溃疡周边及移行区阳性信号增加, GH组和GS组溃疡周边及移行区黏膜阳性信号则较GA组明显增强. 此与免疫组织化学的结果一致. 图像分析结果显示: EGFRmRNA表达阳性密度GA组(18.27±3.95)较正常组(8.52±1.18)增高($P<0.01$), 而GH组(24.61±4.98)和GS组(27.92±5.44)又较GA组明显增高($P<0.05$), 说明随着溃疡的愈合EGFR表达增强.

3 讨论

近年来的研究表明, 消化性溃疡愈合质量的好坏与溃疡复发密切相关, 改善溃疡愈合质量可减少溃疡复发^[3]. 溃疡的愈合过程十分复杂, 涉及到坏死物质的清除, 肉芽组织的生长、新生血管的生成、纤维组织及瘢痕组织的形成、上皮的重构等过程.

溃疡表面的上皮化是溃疡愈合的重要方面, 这主要依赖于EGF和EGFR的作用. EGF可抑制壁细胞分泌胃酸、促进黏膜细胞DNA、RNA及蛋白质合成. 对黏膜上皮及腺体的再生起重要作用, 但他必须与其受体EGFR结合, 以上作用才能得到发挥^[4]. GEF是一带有酪氨酸激酶活性的跨膜粘蛋白, 广泛存在于人及哺乳动物的胃肠黏膜, 具有促进胃肠黏膜增殖、发育及修复, 减少胃酸分泌^[5]等重要功能;对EGF有高度的特异性和亲和力. 当GEF到达靶细胞表面时, 很快与细胞质膜上EGFR结合, 诱导其产生某种变构, 形成二聚体, 激活受体膜内区域的酪氨酸蛋白激酶, 使自身的一系列酪氨酸被磷酸化, 通过GrbZ和Sos最终激活p21^{ras}而传导信号, 调节细胞生长与分化^[6].

已有研究表明^[7], 消化性溃疡患者胃液EGF含量明显降低. 我们发现, 胃溃疡患者胃液EGF的水平明显低于正常人, 与文献的报道一致, 提示EGF的降低可能与胃溃疡的发生有一定的关系;溃疡愈合后其胃液EGF含量亦明显增高, 表明EGF在溃疡愈合中可能起作用. 本研究表明正常时胃黏膜有少量EGFR表达, 胃溃疡时表达增加,

随着溃疡的愈合则表达不断增强;考虑系由于此时胃液EGF含量减少,EGFR为代偿性表达增强.结果提示可通过增加EGFR的表达而促进黏膜上皮增殖,从而加速溃疡重新上皮化和增加黏膜厚度,乃至促进溃疡愈合和提高溃疡愈合质量,如有些治疗胃溃疡的中药其作用靶点是通过增加胃黏膜EGFR的表达进而提高溃疡愈合质量,从而达到抗消化性溃疡复发的目的^[8].

4 参考文献

1 贺建华, 罗和生. 生长因子在消化性溃疡愈合中的作用. 国外医学·消化系统分册 2003;23:12-15

- 2 陈寿坡, 陆国钧, 温淑豪. 消化性溃疡患者唾液、胃液和血清中表皮生长因子含量的研究. 中华消化杂志 1994;14:15-17
- 3 余善强, 周福生, 崔琦珍, 王建华. 溃疡愈合质量研究进展. 华人消化杂志 1998;6:1010-1011
- 4 陈玲, 刘皖君. 表皮生长因子及其生物学效应. 国外医学儿科学分册 1997;24:240-243
- 5 Joshi V, Ray GS, Goldenring JR. Inhibition of parietal cell acid secretion is mediated by the classical epidermal growth factor receptor. *Dig Dis Sci* 1997;42:1194
- 6 许春娣, 陈舜年, 徐家裕. 表皮生长因子在消化性溃疡愈合中的作用. 国外医学儿科学分册 1997;24:123-126
- 7 肖作亮, 王雁, 黎颖哲, 马鸣一, 门子荣, 任继平, 邸霞, 袁申元. 人胃液表皮生长因子在消化性溃疡发生与愈合中的作用. 北京医学 1997;19:289-291
- 8 张炜宁, 张辉, 李家邦. 健胃愈疡颗粒对胃溃疡患者胃黏膜表皮生长因子受体表达的影响. 中西医结合学报 2004;2:24-26

编辑 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 ·

巢式 PCR-RFLP 法对湖南省乙型肝炎病毒 B_i 和 B_a 基因亚型的初步鉴定

温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐 铿

温志立, 杨铁一, 徐铿, 南昌市第一医院消化科 江西省南昌市 330008
谭德明, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008
通讯作者: 温志立, 330008, 江西省南昌市第一医院消化科, wenzhil@126.com
电话: 0791-6768240 传真: 0791-3867593
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 检测湖南省乙型肝炎病毒(HBV)基因亚型(B_i 或 B_a)的分布情况, 了解基因亚型与 HBV 致病性的关系, 希望以此诠释相同基因型 HBV 导致不同病情的机制。

方法: 随机选取经多对型特异性引物巢式 PCR 法鉴定为 B 基因型 HBV 的血清标本 50 例, 包括慢性 HBV 携带者和慢性重型乙型肝炎患者各 25 例, 采用巢式 PCR-RFLP 法鉴定其基因亚型(B_i 或 B_a)。

结果: 50 例 B 基因型 HBV 均为 B_a 亚型, 没有发现 B_i 亚型。

结论: 湖南省 B 基因型 HBV 可能主要为 B_a 亚型. 相同基因型 HBV 导致不同病情的机制可能还与其他因素(如 HBV 准种)有关。

温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿. 巢式 PCR-RFLP 法对湖南省乙型肝炎病毒 B_i 和 B_a 基因亚型的初步鉴定. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1770-1773
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1770.asp>

0 引言

已有研究表明, 东亚地区乙型肝炎病毒(HBV)的基因型以B

型和C型为主^[1], 且C型HBV的致病力强于B型HBV^[2-11]. 虽然HBV基因型能在一定程度上解释乙型肝炎的病情程度、预后和转归, 但我们也很容易发现, 相同基因型的HBV可引起不同的临床表现. 日本和中国都有B型HBV, 但日本B型HBV所致肝炎的症状一般都轻于中国B型HBV. 台湾Kao *et al*^[12]发现B型的年轻患者更易发展成肝癌, 而日本Orito *et al*^[13]的研究结果却恰恰相反. 这种相同HBV基因型患者出现不同病情, 而不同HBV基因型患者却可出现相同病情的现象, 究竟是何原因引起, 除了患者个体差异外, 是否还有HBV基因亚型等因素的影响? 这是一个困扰HBV基因型研究者的难题。

2002年, 日本学者Sugauchi *et al*^[14]测定了70例B型HBV的基因组全序列, 根据前-C区/C区与C型HBV有无重组序列将B型HBV分为B_a和B_j两种亚型. 2003年他发现在1 838位点处所有B_a亚型均为A碱基, 而所有B_j亚型为G碱基, 于是利用这点研制出一种快速简便区分两种亚型的聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法, 即在鉴定B_j亚型时将引物3'端的第4位碱基C改为A, PCR扩增后即可得到SpeI序列(ACTAGT), 经SpeI酶切后如能产生89 bp大小片段即可鉴定为B_j亚型HBV感染; 同样将引物3'端的第3位碱基C改为T, PCR扩增后即可得到MseI序列(TTAA), 经MseI酶切后如能产生89 bp大小片段即可鉴定为B_a亚型HBV感染. 他用