

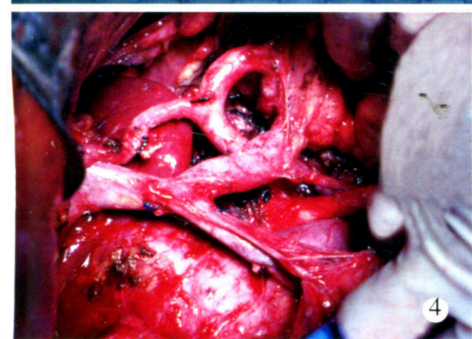
世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 5 月 15 日 第 11 卷 第 5 期

(Volume 11 Number 5)



5/2003

ISSN 1009-3079

名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生



World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

目次

2003 年 5 月 15 日 第 11 卷 第 5 期 (总第 109 期)

述 评	497 刮吸解剖法在肝门胆管癌手术切除中的应用 彭淑牖,刘颖斌 499 我国小肠疾病的研究现状 智发朝 502 2003 年度国家自然科学基金医学和生物学项目指南概述 崔慧斐,江学良,马连生
食 管 癌	508 食管上皮癌变过程中环氧化酶-2 表达上调 齐凤英,张林西,韩彩丽,左连富,林培中,郭建文 512 腺病毒介导的 p27kip1 对食管癌裸鼠模型抑制的作用 张卫国,吴清明,童强,于皆平 517 腺病毒介导的 cox-2 反义 RNA 对食管癌细胞株 DNA 和蛋白质合成的影响 李胜保,吴清明,王强,王小虎,谢国建
胃 癌	522 胃癌 SMAD4/DPC4 杂合性丢失的研究 朱亚青,尹浩然,朱正纲,刘炳亚,张奕,陈雪华,于颖彦,林言箴 526 胃癌增生凋亡与调节基因的表达 潘传敬,刘宽宇 531 慢性萎缩性胃炎胃泌素、生长抑素、表皮生长因子、血管活性肠肽的测定及临床意义 郭昱,郭霞,姚希贤
大 肠 癌	535 CD/5-FC 系统对结肠癌细胞的杀伤作用 黎成金,马庆久,赖大年,鲁建国,王小军,王青,潘伯荣,武永忠,李金茂 540 大肠腺癌组织 Survivin 蛋白的表达意义 肖军,邓长生,朱尤庆
幽门螺杆菌	544 胃癌细胞系幽门螺杆菌感染对金属蛋白酶表达的影响 李新华,张桂英,罗非君,徐美华,李乾 547 表达幽门螺杆菌热休克蛋白 60 克隆的构建 白杨,黄文,林焕健,王继德,陈烨,张兆山,周殿元,张亚历 551 幽门螺杆菌感染者胃黏膜中内质网分子伴侣 Grp94 的表达 王孟春,方文刚,顾金歌,李岩 554 幽门螺杆菌 CagA 蛋白与胃癌组织中 Bcl-2、p53 蛋白表达的关系 杜雅菊,赵晶,赵瑞波,李宝杰 558 根除 <i>H. pylori</i> 后应用灭 <i>Hp</i> 煎剂对慢性胃炎病变的影响 王娜,姚希贤,张琳,白文元,冯丽英 562 <i>Hp</i> 对慢性萎缩性胃炎内皮素及一氧化氮水平影响的实验与临床研究 郭昱,郭霞,姚希贤
基 础 研 究	565 大蒜素对大鼠溃疡性结肠炎淋巴细胞凋亡及其调控蛋白的影响 徐细明,于皆平,何小飞,李军华,郑敏,於亮亮 569 泻剂结肠大鼠结肠中的 μ 、 κ 阿片受体变化 刘宝华,莫平,张胜本 571 香砂平胃散对小鼠胃排空的影响 王学清,王秀杰,李岩 575 术香冲剂对小鼠胃肠动力的影响 李岩,王学清,张卫卫,王江玥 578 EGF 对小肠缺血再灌注后磷酸化 p44/42 MAPK 表达的影响 李平,邢峰,付小兵,杨银辉,郭宝琛
焦 点 论 坛	583 吻合方法对防止胰肠吻合口漏的重要性 彭淑牖,刘颖斌 584 胰十二指肠切除术的适应证 许斌,刘颖斌,王建伟,曹利平,彭淑牖 587 胰十二指肠切除术的主要并发症及诊断与治疗 邓贵龙,李海军,刘颖斌,牟一平,彭淑牖 589 胰十二指肠切除术后胰漏的发生机制 王建伟,许斌,蔡秀军,李海军,刘颖斌,彭淑牖 591 胰肠吻合方法的演进 白明东,刘颖斌,李海军,彭淑牖 593 彭氏捆绑式胰肠吻合术的临床应用 陈晓鹏,刘颖斌,李海军,许斌,王建伟,李江涛,王新保,吴育连 595 彭氏型捆绑式胰肠吻合术 史留斌,方河清,刘颖斌,李海军,王建伟,许斌 596 捆绑式胰肠吻合术防止胰漏的机制 刘颖斌,彭淑牖
文 献 综 述	598 人工肝生物反应器研究进展 向德栋,王英杰,王宇明 601 肝纤维化治疗的新热点-TIMPs 谢玉梅,聂青和 606 p63 基因研究进展 司少艳,张建中 610 老年期消化系疾病的诊疗特点 宋于刚

文献综述	613 胆道系统运动调节及功能性胆道运动异常的诊治 陈仕珠 619 肠黏膜屏障研究进展 武金宝,王继德,张亚历 624 线粒体 DNA 与消化性肿瘤关系的研究进展 韩琤波,李凡,辛彦 628 热休克蛋白在胃溃疡中的表达及意义 向廷秀,王丕龙 632 内镜技术在消化系疾病诊疗中的应用 韩英 635 幽门螺杆菌的研究进展 徐智民,张万岱,周殿元 640 肠镜检查在早期大肠癌诊断中的重要作用 张亚历,周殿元 643 超声内镜检查在胃肠疾病中的临床应用 郭文 646 老年期消化道出血的鉴别诊断与治疗措施 宋卫生,杨希山 649 老年期消化性溃疡临床用药的合理选择 白岚 651 肥大细胞与功能性胃肠疾病 彭丽华,杨云生 654 肝门胆管癌的超声影像学诊断 王彬,陈路增,赵建勋,孙占祺 656 Budd-Chiari 综合征的分型及诊断 许伟华,朱菊人 658 部分脾栓塞术国内应用现状 朱晓玲
研究快报	663 FAK 在大肠癌中的表达及其临床意义 杨红军,丁彦青 665 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响 董卫东,张胜本,刘宝华,张连阳,黄显凯,高峰 668 胃癌患者血清 TNF- α 的水平及意义 陈剑群,许统俭,安侠,王营,陈玉林
临床经验	670 前列腺素 E ₁ 对急性胰腺炎二十碳烯酸异常代谢调节的临床研究 李庭赞,孙丹莉,孙士其 671 肝硬化腹水并发肝肾综合征及低渗性脑病与限钠治疗关系的研究 刘建军,智红,吴晓英,李楠 673 金属夹联合内镜注射治疗胃肠道出血 王孟春,李立,常桂艳,孙思予,孙素云 675 内镜诊疗实现无痛苦操作的临床评价 游旭东,陈玲玲,郑晓蕾,王鹏,吴永伟,孔晓丽,许元印 677 经皮经肝胆囊引流治疗急性胆囊炎和重症胆管炎的价值 张国梁,朱春兰,任旭 679 进展期胰腺癌 299 例 王成锋,赵平,李文波,宋德余 681 食管、贲门癌染色体异常分析及意义 武珊珊,刘吉福,王明荣 684 空回肠出血 27 例 石力,田伏洲,李旭,周庆贤,赵碧,薛刚 686 食管鳞癌免疫组化彩色图像定量分析 韩永,徐燕杰,李宁,布和,宋晶莹,赵敏
病例报告	662 大肠 3 原癌 1 例 姚红兵,吴爱国,朱卉娟
封面故事	605 浙江大学医学院附属第二医院外科

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
 陈可冀 题写版权刊名
 (月刊)
 创刊 1993-01-15
 改刊 1998-01-25
 出版 2003-05-15
 原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀	张金哲
黄象谦	张学庸
黄志强	赵东海
黎介寿	周殿元
刘耕陶	社长总编辑 马连生
裘法祖	中文编辑 潘伯荣
汤钊猷	王瑾晖
王宝恩	英文编辑 张建中
危北海	排版 李少华
吴孟超	校对 李天华
吴咸中	

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
 E-mail: wcjd@wjgnet.com
 出版 世界胃肠病学杂志社
 100023, 北京市 2345 信箱
 E-mail: wcjd@wjgnet.com
 http://www.wjgnet.com
 电话 (010)85381892
 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 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)85381892
 传真: (010)85381893
 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
 检索系统收录
 美国《化学文摘(CA)》
 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
 俄罗斯《文摘杂志()》
 中国科技论文统计与分析
 中国学术期刊文摘
 中国中医药信息服务网
 中国生物医学文献光盘数据库
 《中文科技资料目录(医药卫生)》
 中国生物医学期刊目次数据库
 中国医学文摘外科学分册(英文版)
 中国医学文摘内科学分册(英文版)

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.

ISSN 1009-3079
 CN 14-1260/R

邮发代号 82-262
 国外代号 M 4481

国内定价
 每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证
 1401004000050

COMMENTARY

Application of scraping and suctioning dissection in surgical remove of cholangiocarcinoma in porta hepatis

Peng SY, Liu YB 497

Current status of intestinal diseases in China

Zhi FC 499

Introduction to application directory of National Natural Science Foundation of China (Medicine and Biology, 2003)

Cui HW, Jiang XL, Ma LS 502

ESOPHAGEAL CANCER

Up-regulation of cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of esophageal epithelia

Qi FY, Zhang LX, Han CL, Zuo LF, Lin PZ, Guo JW 508

Inhibitory effect of p27kip1 mediated by adenovirus on model of esophageal carcinoma in nude mice

Zhang WG, Wu QM, Tong Q, Yu JP 512

Effects of adenovirus-mediated human cox-2 antisense RNA on synthesis of DNA and proteins in esophageal carcinoma cell line

Li SB, Wu QM, Wang Q, Wang XH, Xie GJ 517

GASTRIC CANCER

Loss of heterozygosity of SMAD4/DPC4 in gastric carcinoma

Zhu YQ, Yin HR, Zhu ZG, Liu BY, Zhang Y, Chen XH, Yu YY, Lin YZ 522

Proliferation/apoptosis and expression of P53 and Bcl-2 in gastric carcinoma

Pan CJ, Liu KY 526

Changes of gastrointestinal hormones in chronic atrophic gastritis and their clinical significance

Guo Y, Guo X, Yao XX 531

LARGE INTESTINAL CANCER

Killing effect of CD/5-FC system on human colon cancer cell lines SW 480 and LoVo

Li CJ, Ma QJ, Lai DN, Lu JG, Wang XJ, Wang Q, Pan BR, Wu YZ, Li JM 535

Expression of survivin protein in colorectal adenocarcinoma

Xiao J, Deng CS, Zhu YQ 540

H.pylori

Influence of expression of matrix metalloproteinase induced by *H. pylori* infection in gastric cancer cell line

Li XH, Zhang GY, Luo FJ, Xu MH, Li Q 544

Construction of clone expressing adhesin Hsp60 of *Helicobacter pylori*

Bai Y, Huang W, Lin HJ, Wang JD, Chen Y, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL 547

Expression of glucose-regulation protein 94 in gastric mucosa infected

with *Helicobacter pylori*

Wang MC, Fang WG, Gu JG, Li Y 551

Relationship between expression of Bcl-2 and p53 protein and CagA⁺ *Helicobacter pylori* in gastric cancer

Du YJ, Zhao J, Zhao RB, Li BJ 554

Histologic changes after *H.pylori* eradication with Killing *Hp* decoction for chronic gastritis

Wang N, Yao XX, Zhang L, Bai WY, Feng LY 558

Changes of nitricoxide and endothelin in *Helicobacter pylori* associated chronic atrophic gastritis before and after eradication: an experimental and clinical study

Guo Y, Guo X, Yao XX 562

BASIC RESEARCH

Effects of allitridi on lymphocyte apoptosis and its regulatory gene expression in rat ulcerative colitis

Xu XM, Yu JP, He XF, Li JH, Zheng M, Yu LL 565

Changes of mu and kappa opioid receptors in cathartic colon of rats

Liu BH, Mo P, Zhang SB 569

Effect of Xiangsha Pingweisan on gastric emptying motility in mice

Wang XQ, Wang XJ, Li Y 571

Effect of Zhuxiang powder on gastric and intestinal motility in mice

Li Y, Wang XQ, Zhang WW, Wang JY 575

Effects of EGF on expression of phosphorylated p44/42 MAPK in rat small intestine after ischemia-reperfusion injury

Li P, Xin F, Fu XB, Yang YH, Guo BC 578

FOCUSED FORUM

The significance of pancreaticojejunostomy method on prevention of pancreatic leakage

Peng SY, Liu YB 583

Diagnosis and treatment of principal complications of pancreaticojejunostomy

Deng GL, Li HJ, Liu YB, Mou YP, Peng SY 587

Mechanisms of pancreatic leakage after pancreaticoduodenectomy

Wang JW, Xu bin, Cai XJ, Li HJ, Liu YB, Peng SY 589

The development of pancreaticojejunostomy methods

Bai MD, Peng CH, Liu YB, Peng SY, Li HJ 591

The clinic application of Peng's binding pancreaticojejunostomy

Cheng XP, Wu YL, Liu YB, Peng SY, Li HJ 593

Type Peng's binding pancreaticojejunostomy

Shi LB, Fang HQ, Liu YB, Li HJ, Wang JW, Xu B 595

Mechanisms of binding pancreaticojejunostomy to prevent pancreatic leakage

Liu YB, Peng SY 596

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi \$

World Chinese Journal of Digestology
Monthly \$ \$

Founded on 15th January, 1993

Renamed on 25th January, 1998

Publication date 15th May, 2003

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/R

Edited by Editorial Board of World Chinese Journal of Digestology
P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

77, Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Overseas Distributor China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China **Code No.** M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

Copyright © 2003 by The WJG Press

Indexed/

Abstracted by

Chemical Abstracts

EMBASE/

Excerpta Medica

Abstract Journal

大蒜素对大鼠溃疡性结肠炎淋巴细胞凋亡及其调控蛋白的影响

徐细明,于皆平,何小飞,李军华,郑敏,於亮亮

徐细明,于皆平,李军华,於亮亮,武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
何小飞,咸宁医学院附属医院消化内科 湖北省咸宁市 437100
郑敏,咸宁医学院中心实验室 湖北省咸宁市 437100
徐细明,男,1976-08-06生,湖北省武汉市人,汉族,武汉大学人民医院消化内科
硕士研究生,主要从事溃疡性结肠炎的基础与临床研究.
湖北省教育厅基金资助课题, No.2002A04006
项目负责人:何小飞,437100,湖北省咸宁市,咸宁医学院附属医院消化内科.
doctorhe120@hotmail.com
电话:0715-8255334-2201
收稿日期:2002-10-09 接受日期:2002-10-22

Effects of allitridi on lymphocyte apoptosis and its regulatory gene expression in rat ulcerative colitis

Xi-Ming Xu, Jie-Ping Yu, Xiao-Fei He, Jun-Hua Li, Min Zheng, Liang-Liang Yu

Xi-Ming Xu, Jie-Ping Yu, Jun-Hua Li, Liang-Liang Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Xiao-Fei He, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Xianning Medical College, Xianning 437100, Hubei Province, China
Min Zheng, The Center for Laboratory Medicine, Xianning Medical College, Xianning 437100, Hubei Province, China
Supported by the Educational Foundation of Hubei Province, No.2002A04006
Correspondence to: Dr. Xiao-Fei He, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Xianning Medical College, Xianning 437100, Hubei Province, China. doctorhe120@hotmail.com
Received: 2002-10-09 Accepted: 2002-10-22

Abstract

AIM: To investigate the effects of Allitridi on lymphocyte apoptosis and its regulatory gene expression in rat ulcerative colitis.

METHODS: Rat colitis model was induced by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). The apoptotic cells were visualized by TUNEL. Bcl-2 and Bax protein expression in colon tissue was examined by immunohistochemistry. Biochemistry was used to detect the nitrogen monoxide (NO) activity in the mucosa. At the same time, the macroscopical and histological changes of the colon were evaluated.

RESULTS: In TNBS group, the content of nitrogen monoxide, the positive cell quantity of expression of Bcl-2 and the apoptotic cell quantity were higher than those in both normal group and TNBS+Alt group ($P < 0.01$), but Bax positive cell quantity was lower than that in normal group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Allitridi has protective effects on ulcerative colitis of rat by promoting apoptosis of lymphocytes in lamina propria and cleaning NO free radical.

Xu XM, Yu JP, He XF, Li JH, Zheng M, Yu LL. Effects of allitridi on lymphocyte apoptosis and its regulatory gene expression in rat ulcerative colitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(5):565-568

摘要

目的: 通过观察大鼠溃疡性结肠炎淋巴细胞凋亡及其调控蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达及大蒜素对其的影响, 探讨大蒜素 (Allitridi, Alt) 对溃疡性结肠炎肠黏膜的保护作用及其机制。

方法: 用三硝基苯磺酸 (TNBS) 建立大鼠溃疡性结肠炎模型。将动物随机分为空白对照组 (Normal group)、三硝基苯磺酸组 (TNBS group)、三硝基苯磺酸 + 生理盐水组 (TNBS+NS group)、三硝基苯磺酸 + 大蒜素组 (TNBS+Alt group) 四组。利用 DNA 缺口末端标记技术 (TUNEL 法) 和 Bcl-2、Bax 蛋白免疫组化染色, 分别检测溃疡性结肠炎大鼠肠组织中的淋巴细胞凋亡和淋巴细胞 Bcl-2 和 Bax 的表达, 生化检测一氧化氮 (NO) 含量, 并观察肠道大体形态和组织学改变。

结果: 和三硝基苯磺酸组相比, 三硝基苯磺酸 + 大蒜素组中淋巴细胞凋亡增加 (2.1 ± 1.0 vs 5.9 ± 2.0 , $P < 0.01$), Bcl-2 表达阳性淋巴细胞减少及一氧化氮 (NO) 含量下降 (10.0 ± 2.5 vs 31.0 ± 6.0 , 197 ± 11 vs 523 ± 40 , $P < 0.01$)。损伤指数明显下降 (1.6 ± 0.5 vs 5.8 ± 0.7 , 2.1 ± 0.6 vs 6.1 ± 0.6 , $P < 0.01$)。

结论: 大蒜素可以通过促进淋巴细胞凋亡和清除 NO 自由基而对 TNBS 诱导的溃疡性结肠炎肠黏膜有保护作用。

徐细明,于皆平,何小飞,李军华,郑敏,於亮亮. 大蒜素对大鼠溃疡性结肠炎淋巴细胞凋亡及其调控蛋白的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(5):565-568
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/565.htm>

0 引言

溃疡性结肠炎 (UC) 为肠道的慢性非特异性炎症性疾病, 其发病与感染、遗传、免疫异常等相关^[1-6]。细胞凋亡参与了 UC 的发病^[9-14], 其中, 肠上皮细胞的凋亡加速和炎性细胞的凋亡减慢是 UC 炎症持续的主要因素。炎性细胞中淋巴细胞的凋亡减慢和 UC 的发生关系密切^[16-18]。大蒜素 (Alt) 具有抗炎、抗真菌、抗氧化、抗肿瘤等多种生物学活性。有可能对 UC 大鼠肠黏膜有一定的保护作用, 我们观察大蒜素对大鼠 UC 肠组织中淋巴细胞凋亡及其调控蛋白的影响, 探讨大蒜素对 UC 肠黏膜的保护作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF 级健康成年 SD 大鼠 48 只, 雌雄各半,

质量 150-200 g, 由湖北省医学科学院实验动物中心提供。2、4、6-三硝基苯磺酸(TNBS)(Sigma);大蒜素, 湖北五三制药厂生产, Bcl-2和Bax单抗(即用型), 武汉博士德公司;细胞凋亡检测试剂盒和SP试剂盒为北京中山公司产品;NO检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

1.2方法 将48只动物随机分为空白对照组(Normal group)、三硝基苯磺酸组(TNBS group)、三硝基苯磺酸+生理盐水组(TNBS+NS group)、三硝基苯磺酸+大蒜素组(Alt group)4组。所有用药组大鼠术前禁食24 h, 自由饮水。造模时用乙醚麻醉大鼠后, 用一直径2.0 mm, 长约12 cm的硅胶管由肛门轻缓插入深约8 cm, 三硝基苯磺酸组以含150 mg/kg TNBS的500 mL/L乙醇溶液0.85 mL缓缓推入大鼠结肠, 诱导UC形成^[19]。三硝基苯磺酸+生理盐水组大鼠以及三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠在灌肠2 d开始每天分别以4 mL的生理盐水和30 mg/kg的大蒜素对其进行灌胃, 1次/d, 至3 wk后处死动物, 取肛门至盲肠段结肠(约8 cm), 沿肠系膜纵轴剪开, 冷生理盐水冲洗干净, 肉眼进行大体形态评分。肠组织一部分以40 g/L的多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m连续切片, HE染色镜下评价炎症和溃疡, 另一部分-20 $^{\circ}$ C冻存, 用以NO检测(采用酶标法测定, 具体操作按照试剂盒说明书进行)。大体形态损伤评分指标包括粘连、局部充血、溃疡及炎症。粘连及充血按有无及轻重分别计0、1、2分, 出现炎症、溃疡数目增加1个、溃疡面积>2 cm时范围每增加1 cm计分均加1。组织学指标包括溃疡、炎症、肉芽肿、纤维化及病变深度, 按有无及轻重分别计0、1、2分, 病变深度达黏膜下层、肌层、浆膜层分别计1、2、3分, 各项相加得总分。

1.2.1 TUNEL染色 切片脱蜡入水 蛋白酶K(20 mg/L)消化15 min 新鲜配制10 mL/L H₂O₂/甲醇溶液封闭内源性过氧化物酶(POD)5 min 加TUNEL反应混合液含TdT酶和带地高辛的标记液, 37 $^{\circ}$ C湿盒孵育1 h PBS(pH=7.2)漂洗, 3 min \times 3次 加POD转换液37 $^{\circ}$ C 30 min PBS漂洗3 min \times 3次 二氨基联苯胺染色(DAB)显色 苏木素复染 光镜观察。上述步骤中不加TdT酶作为阴性对照, 并同时取另一张切片作HE染色以定位判断。光镜下正常淋巴细胞核呈蓝色, 凋亡细胞核为深浅不一的棕褐色(图1)。

1.2.2 肠组织淋巴细胞Bcl-2和Bax表达 采用免疫组织化学SP法, 取石蜡切片(4 μ m)常规二甲苯脱蜡, 下行梯度酒精水化, 置0.05 mol/L柠檬酸缓冲液中进行微波抗原修复, 凉至室温;30 mL/L H₂O₂孵育10 min以消除内源性过氧化物酶活性, 滴加100 mL/L正常血清封闭非特异性抗原;倾去血清, 滴加Bcl-2和Bax抗体(即用型), 4 $^{\circ}$ C放置过夜, PBS冲洗3 \times 5 min, 滴加生物素化二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育10 min, PBS冲洗3 \times 5 min;滴加辣根过氧化物酶标记的卵白素工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育

15 min;DAB显色, 苏木素复染, 中性树脂封片。阳性对照为已知的Bcl-2和Bax蛋白, 以PBS代替一抗作阴性对照。每张切片随机选取5个高倍视野, 计数1000个细胞, 计算阳性细胞百分比;以16D目镜测微网(面积为0.1024 mm²)在400倍放大下计数阳性细胞数。

统计学处理 所有实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用单因素方差分析处理, 以 $P<0.01$ 为有统计学意义。

2 结果

各用药组大鼠在灌肠后24 h有腹泻, 黏液水便或血性腹泻现象出现。3 wk后, 三硝基苯磺酸组和三硝基苯磺酸+生理盐水组大鼠结肠肉眼观可见近端肠腔扩张, 结肠组织与周围粘连, 黏膜水肿、溃疡, 有少量点状和片状出血。光镜下, 可见溃疡和炎性渗出物, 炎症累及肠壁全层, 腺体排列不齐, 杯状细胞减少甚至消失。固有层有大量中性粒细胞浸润。可见数量不等的单核细胞和嗜酸性粒细胞, 也可见增生的纤维母细胞, 损伤指数比空白对照组和三硝基苯磺酸+大蒜素组显著增高($P<0.01$, 表1)。三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠结肠肉眼观黏膜水肿较轻, 溃疡和炎性渗出物较少见, 光镜下结肠结构基本正常, 黏膜上皮为单层柱状上皮, 由杯状细胞组成, 固有层中腺体呈管状, 可见少量淋巴细胞和中性粒细胞, 黏膜肌层、黏膜下层结构清晰, 损伤指数显著降低, 对照组无腹泻, 黏膜光滑、腺体排列整齐、结构清晰。

2.1 一氧化氮含量 在三硝基苯磺酸组大鼠肠组织中, 一氧化氮含量较空白对照组显著增高($P<0.01$)。而三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠组织中, 一氧化氮含量较三硝基苯磺酸组明显下降($P<0.01$, 表1)。三硝基苯磺酸组与三硝基苯磺酸+生理盐水组相比, 大鼠肠组织中一氧化氮含量无明显改变。

2.2 Bcl-2和Bax表达 阳性细胞表现为胞质呈棕褐色(图1, 2)。正常大鼠肠黏膜固有层中Bcl-2表达阳性淋巴细胞较少($9.8\pm 1.4\%$), 在三硝基苯磺酸组大鼠肠黏膜固有层中, Bcl-2表达阳性淋巴细胞数($31.0\pm 6.0\%$)明显增加($P<0.01$)。而三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠黏膜固有层中, Bcl-2表达阳性淋巴细胞数($10.1\pm 2.5\%$)较三硝基苯磺酸组大鼠明显减少($P<0.01$)。空白对照组大鼠肠黏膜固有层中较多见Bax表达阳性淋巴细胞($30.1\pm 9.7\%$)。三硝基苯磺酸组大鼠肠黏膜固有层中则较少见($P<0.01$)。和三硝基苯磺酸组相比, 三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠黏膜固有层中, Bax表达阳性淋巴细胞数未见明显改变(表2)。

2.3 TUNEL表达 正常大肠组织仅可见表皮有阳性表达。三硝基苯磺酸组大鼠肠黏膜固有层中可见少量淋巴细胞和其他炎性细胞有阳性表达。在三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠黏膜固有层中, TUNEL染色阳性淋巴细胞数量较三硝基苯磺酸组大鼠明显增加($P<0.01$, 表2, 图3, 4)。

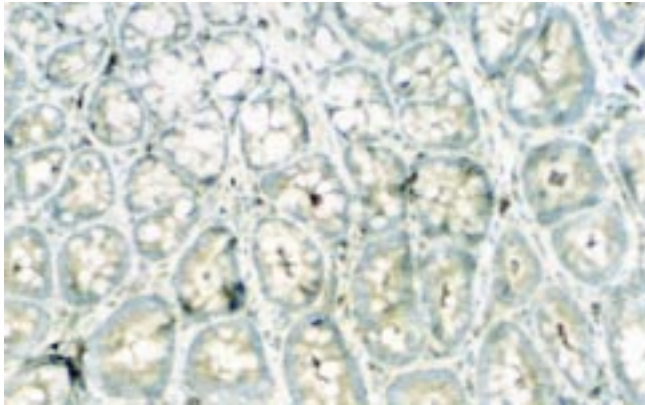


图1 淋巴细胞中 Bcl-2 的表达(TNBS+Alt 组,×200).

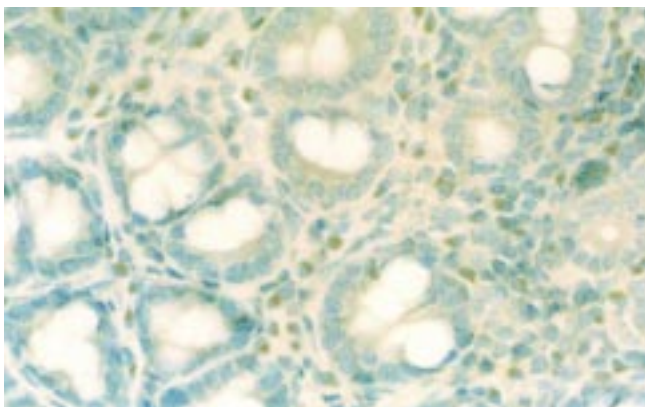


图2 淋巴细胞中 Bcl-2 的表达(TNBS 组,×400).

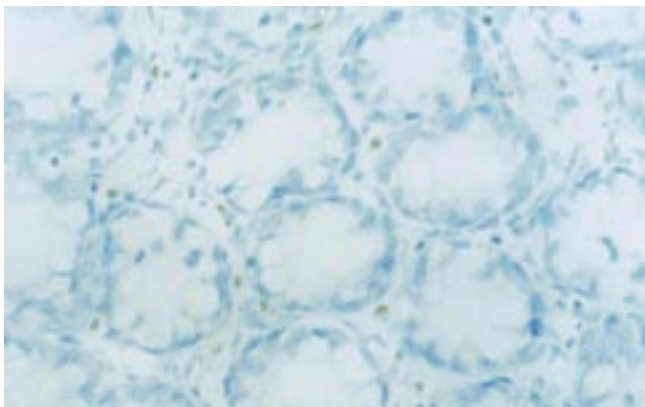


图3 淋巴细胞中 TUNEL 阳性表达(TNBS+Alt 组,×400).

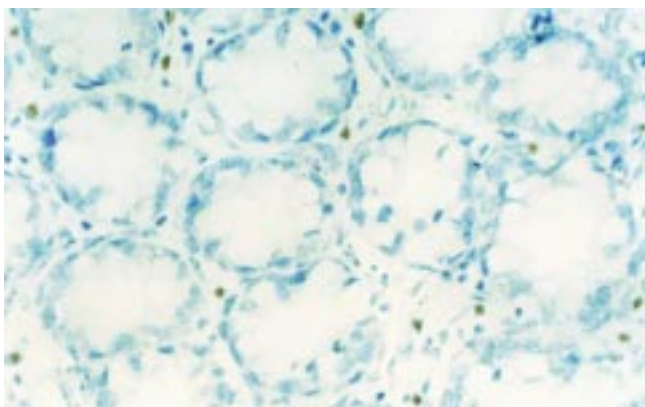


图4 淋巴细胞中 TUNEL 阳性表达(TNBS 组,×400).

表1 各组中组织损伤评分及肠组织中NO浓度($\mu\text{mol/g}$)改变的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	大体形态	组织学	NO($\mu\text{mol/g}$)
Normal 组	1.4 \pm 0.5	1.6 \pm 0.7	189 \pm 18
TNBS 组	5.8 \pm 0.7 ^b	6.1 \pm 0.6 ^b	523 \pm 40 ^b
TNBS+NS 组	5.6 \pm 0.5 ^b	5.5 \pm 0.9 ^b	518 \pm 42 ^b
TNBS+Alt 组	1.6 \pm 0.5 ^{df}	2.1 \pm 0.6 ^{df}	197 \pm 11 ^{df}

^bP < 0.01, vs Normal ^dP < 0.01, vs TNBS ^fP < 0.01, vs TNBS+NS.表2 各组中 Bcl-2、Bax、TUNEL 阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

	Bcl-2 阳性 细胞数 %	Bax 阳性 细胞数 %	TUNEL 阳性 细胞数 %
Normal 组	9.8 \pm 1.4	30.1 \pm 9.7	1.8 \pm 0.7
TNBS 组	31.0 \pm 6.0 ^b	9.9 \pm 4.8 ^b	5.9 \pm 2.0 ^b
TNBS+NS 组	32.4 \pm 7.7 ^b	9.6 \pm 4.6 ^b	6.4 \pm 1.3 ^b
TNBS+Alt 组	10.0 \pm 2.5 ^{df}	13.1 \pm 2.5	2.1 \pm 1.0 ^{df}

^bP < 0.01, vs Normal ^dP < 0.01, vs TNBS ^fP < 0.01, vs TNBS+NS.

3 讨论

细胞凋亡(Apoptosis)是细胞接受刺激信号后一种主动的,由凋亡相关基因控制的细胞程序性死亡方式.细胞凋亡与UC的关系近年来已经成为UC研究的又一热点^[15-18,20-22]. Bcl-2蛋白是一个公认的细胞凋亡抑制基因,Bax是Bcl-2的同源蛋白,Bcl-2/Bax的比率可以调节细胞凋亡的速率^[18]. UC中肠道局部炎症损伤是其重要病理改变,大量炎症细胞浸润肠壁和持续活化是其主要特征.在UC中,淋巴细胞的凋亡与UC的发生、发展关系密切,肠黏膜固有层淋巴细胞的凋亡延迟是UC肠黏膜炎症持续和进展的主要原因之一^[11,15].淋巴细胞中Bcl-2蛋白和Bax蛋白的表达强弱可以调节淋巴细胞的凋亡,从而使UC肠黏膜炎症好转或加重. UC肠组织中淋巴细胞的凋亡延迟,Bcl-2阳性细胞的表达增多,Bax阳性细胞的表达则较少见^[10],本实验也证实了这一结果.而且本实验中TNBS+Alt组淋巴细胞的凋亡增多,Bcl-2表达阳性淋巴细胞数减少,Bax阳性细胞数未见明显改变.说明大蒜素可以通过减少Bcl-2蛋白的表达加快肠黏膜固有层淋巴细胞的凋亡,而对UC有预防和治疗作用.

NO是一种广泛存在与机体的生物活性物质,参与机体的炎症反应.NO是调节胃肠道血流、胃肠道分泌和胃肠道运动的一种重要化学物质.大量的资料证实,NO在UC的发病中有重要作用^[23-31].一氧化氮对UC肠黏膜的作用是双重的,在UC早期,NO通过增加靶细胞内5-环磷酸鸟苷(5-cGMP)浓度及抑制P-选择素基因表达,维持微循环的完整性,抑制血小板、白细胞在内皮细胞表面的黏附,积聚,防止血栓形成和内皮细胞与中性粒细胞、单核细胞的相互作用,而对肠黏膜起保护作用.另一方面,在UC中晚期,随着

NO产生增多和积聚,他很容易在O⁻存在时转变为氧化亚硝酸,进一步分解为OH⁻和NO,通过自由基链式反应导致含巯基蛋白和脂质过氧化,从而促进肠黏膜的细胞损伤。另外,NO还可以调节多种细胞因子的表达,促进细胞凋亡的发生。UC病变黏膜中NO浓度的增加与炎症程度呈平行关系,说明NO参与UC的病理生理过程。本实验的研究结果也证实了这一点,和三硝基苯磺酸组大鼠相比,三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠组织中NO浓度明显下降,说明减少肠组织中NO的生成也是大蒜素对UC肠黏膜起保护作用的机制之一。

本实验通过在建立大鼠UC模型的同时用大蒜素灌胃进行保护,结果三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠黏膜的大体形态和组织学损伤评分指数明显低于单纯三硝基苯磺酸组,表明大蒜素对大鼠UC有防治作用。实验结果同时表明大蒜素治疗组大鼠肠组织中NO浓度下降,并且淋巴细胞的凋亡增加。提示大蒜素对大鼠UC的治疗作用可能与其清除NO自由基、诱导淋巴细胞凋亡有关。

4 参考文献

- Wu HG, Lu HB, Zhao C, Shi Z, Liu HR, Chen HP. The mechanism of iNOS gene modulation on acupuncture and moxibustion treatment for ulcerative colitis in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):64
- Xia B, Guo HJ, Crusius JBA, Deng CS, Meuwissen SGM, Pena AS. In vitro production of TNF α , IL-6 and sIL-2R in Chinese patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 1998;4:252-255
- Xu CT, Pan BR. Current medical therapy for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 1999;5:64-72
- Wu HG, Zhou LB, Pan YY, Huang C, Chen HP, Shi Z, Hua XG. Study of the mechanisms of acupuncture and moxibustion treatment for ulcerative colitis rats in view of the gene expression of cytokines. *World J Gastroenterol* 1999;5:515-517
- Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:158-161
- Geng X, Taniguchi M, Dai HH, Lin JJC, Lin J, Das KM. Autoimmunity in ulcerative colitis: humoral and cellular immune response by tropomyosin in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):9
- Xu G, Tian KL, Liu GP, Zhong XJ, Tang SL, Sun YP. Clinical significance of plasma D-dimer and von Willebrand factor levels in patients with ulcer colitis. *World J Gastroenterol* 2002;8:575-576
- Jiang XL, Quan QZ, Liu T, Dong XC. Recent advances in research of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:216-218
- Brannigan AE, O'Connell PR, Hurley H, O'Neill A, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock* 2000;13:361-366
- Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol* 2001;22:21-26
- Suzuki A, Sugimura K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Suzuki K, Ishizuka K, Mochizuki T, Honma T, Narisawa R, Asakura H. Fas/Fas ligand expression and characteristics of primed CD45RO⁺ T cells in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1278-1283
- Iimura M, Nakamura T, Shinozaki S, Iizuka B, Inoue Y, Suzuki S, Hayashi N. Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 2000;47:228-235
- Mallolas J, Esteve M, Rius E, Cabre E, Gassull MA. Antineutrophil antibodies associated with ulcerative colitis interact with the antigen(s) during the process of apoptosis. *Gut* 2000;47:74-78
- Jiang XL, Quan QZ, Cheng GR, Sun ZQ, Wang YJ, Wang YP. Expression of apoptosis on biopsy tissue in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:107-108
- Yeung MM, Melgar S, Baranov V, Oberg A, Danielsson A, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Characterisation of mucosal lymphoid aggregates in ulcerative colitis: immunecell phenotype and TcR-gammadelta expression. *Gut* 2000;47:215-227
- Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000;6:583-588
- Jiang XL, Quan QZ, Sun ZQ, Wang YJ, Qi F, Wang D, Zhang XL. Expression of lymphocyte apoptosis in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:903-904
- Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, Isozaki K, Kitamura S, Kondo S, Miyagawa J, Kanayama S, Shinomura Y, Ishikawa H, Ohtani T, Nezu R, Nagata S, Matsuzawa Y. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut* 1998;43:48-55
- Zheng L, Gao ZQ, Wang SX. A chronic ulcerative colitis model in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:150-152
- Hagiwara C, Tanaka M, Kudo H. Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:758-764
- Yukawa M, Iizuka M, Horie Y, Yoneyama K, Shirasaka T, Itou H, Komatsu M, Fukushima T, Watanabe S. Systemic and local evidence of increased Fas-mediated apoptosis in ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:70-76
- Bregenholt S, Petersen TR, Claesson MH. The majority of lamina propria CD4(+) T-cells from scid mice with colitis undergo Fas-mediated apoptosis in vivo. *Immunol Lett* 2001;78:7-12
- Wen B, Ma GF. Determination of plasma nitric oxide, molitin and their significances in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 1998;4(Suppl 2):69
- Ariake K, Ohkusa T, Sakurazawa T, Kumagai J, Eishi Y, Hoshi S, Yajima T. Roles of mucosal bacteria and succinic acid in colitis caused by dextran sulfate sodium in mice. *J Med Dent Sci* 2000;47:233-241
- Koek GH, Verleden GM, Evenepoel P, Rutgeerts P. Activity related increase of exhaled nitric oxide in Crohn's disease and ulcerative colitis: a manifestation of systemic involvement? *Respir Med* 2002;96:530-535
- Yamaguchi O, Sugimura K, Ishizuka K, Suzuki K, Hasegawa K, Ohtsuka K, Honma T, Asakura H. Correlation between serum phospholipase A(2) IIA levels and histological activity in patients with ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:311-316
- Chen W, Li D, Wilson I, Chadwick VS. Detection of Chlamydia pneumoniae by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:987-993
- Gan H, Ouyang Q, Jia D, Xia Q. Activation of nuclear factor-kappaB and its relationship with cytokine gene expression in colonic mucosa of ulcerative colitis patients. *Zhonghua Neike Zazhi* 2002;41:252-255
- Sjoqvist U, Hertervig E, Nilsson A, Duan RD, Ost A, Tribukait B, Lofberg R. Chronic colitis is associated with a reduction of mucosal alkaline sphingomyelinase activity. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:258-263
- Selby WS, Griffin S, Abraham N, Solomon MJ. Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis but does not affect its course. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2834-2838
- Koek GH, Verleden GM, Evenepoel P, Rutgeerts P. Activity related increase of exhaled nitric oxide in Crohn's disease and ulcerative colitis: a manifestation of systemic involvement? *Respir Med* 2002;96:530-535



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

