

# 世界华人消化杂志®

## WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2013年1月8日 第21卷 第1期 (Volume 21 Number 1)



### 1/2013

ISSN 1009-3079



《世界华人消化杂志》是一份同行评议性的旬刊，是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被《Chemical Abstracts》，《EMBASE/Excerpta Medica》，《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

2012-01-01/2014-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

《世界华人消化杂志》编辑委员会成员，由483位专家组成，分布在30个省市，自治区，特别行政区。其中，上海市81位、北京市70位、广东省40位、江苏省38位、辽宁省24位、陕西省22位、黑龙江省20位、湖北省18位、天津市16位、吉林省15位、湖南省14位、福建省13位、山东省13位、广西壮族自治区11位、河北省10位、四川省10位、浙江省10位、重庆市9位、安徽省8位、江西省8位、贵州省7位、新疆维吾尔自治区6位、云南省6位、海南省2位、河南省3位、甘肃省2位、宁夏回族自治区2位、山西省2位、内蒙古自治区1位和香港特别行政区1位。

### 总顾问

陈可冀教授  
黄志强教授  
纪小龙教授  
王小恩教授  
王苑本教授  
杨春波教授  
杨思凤教授  
姚希贤教授  
张万岱教授  
周学文教授

### 名誉主编

潘伯荣教授

### 主编

程英升教授  
党双锁教授  
江学良教授  
刘连新教授  
刘占举教授  
吕宾教授  
马大烈教授  
王小众教授  
姚登福教授  
张宗明教授

### 编委

#### 消化内科学

白爱平副教授  
白岚教授  
卜平教授  
陈国忠主任医师  
陈洪刚教授  
陈其奎教授  
陈卫昌教授  
陈贻胜教授  
程斌教授  
迟宝荣教授  
崔立红教授  
邓鑫教授  
丁士刚教授  
董蕾教授  
杜雅菊主任医师  
杜奕奇副教授  
樊冬梅副主任医师  
樊晓明教授  
房静远教授

冯志杰主任医师  
傅春彬主任医师  
甘华田教授  
高凌副教授  
戈之铮教授  
关玉盘教授  
关晓辉主任医师  
郭晓钟教授  
郝建宇教授  
郝丽萍副教授  
何继满教授  
何松教授

洪天配教授  
黄培林教授  
黄晓东主任医师  
黄颖秋教授  
黄缘教授  
李国忠教授  
江米足教授  
姜春萌教授  
姜慧卿教授  
姜相君主任医师  
金瑞教授  
蓝宇教授  
李淑德教授  
李瑜元教授  
李玉民教授  
廖家智副主任医师

林志辉教授  
刘冰熔教授  
刘凤斌教授  
刘改芳主任医师  
刘海峰主任医师  
刘海林主任医师  
刘亮明副教授  
陆伦根教授  
马红主任医师  
马欣主任医师  
毛恩强教授  
毛高平教授  
孟庆华教授  
缪应雷主任医师  
倪润洲教授  
欧希龙副教授  
潘秀珍教授  
潘阳林副教授  
朴云峰教授  
秦成勇教授

任粉玉教授  
任建林教授  
邵先玉教授  
沈琳主任医师  
沈薇教授  
施瑞华教授  
宋军副教授  
唐世刚教授  
田宇彬教授  
度必光教授  
宛新建副教授  
王邦茂教授  
王炳元教授  
王承党教授  
王江滨教授  
王俊平教授  
王蔚虹教授  
王晓艳副教授  
夏冰教授  
夏时海副教授  
徐灿霞教授  
徐可树教授  
杨建民教授  
张国主任医师  
姚树坤教授  
张国梁主任医师  
张军教授  
张庆瑜教授  
张小晋主任医师  
张筱茵副教授  
张志坚教授  
郑培永教授  
郑鹏远教授  
郑素军副主任医师  
郑勇教授  
周国雄主任医师  
周宇教授  
邹晓平主任医师  
诸琦教授  
于珮主任医师

#### 消化外科学

白雪副主任医师  
白雪巍副主任医师  
白玉作教授  
蔡开琳副教授  
蔡三军主任医师  
曹杰主任医师

陈炳官教授  
陈光教授  
陈海龙教授  
陈积圣教授  
陈进宏副主任医师  
陈凜教授  
陈汝福教授  
陈亚军主任医师  
陈钟教授  
程爱国教授  
程树群副教授  
崔云甫教授  
戴朝六教授  
戴冬秋教授  
丁义涛教授  
杜顺达副教授  
房林教授  
傅红副教授  
傅华群教授  
傅思源副教授  
傅晓辉副教授  
傅志仁主任医师  
高毅主任医师  
葛海燕教授  
巩鹏副教授  
谷俊朝主任医师  
顾国利副主任医师  
顾岩教授  
韩天权教授  
郝纯毅主任医师  
郝立强副教授  
何超教授  
何向辉教授  
何晓顺教授  
何裕隆教授  
胡安斌副教授  
黄志勇教授  
季加孚教授  
姜卫东教授  
姜波健教授  
金山主任医师  
孔静副教授  
黎乐群教授  
李革副教授  
李国威教授  
李华副教授  
李华山主任医师  
李升平教授

李胜研究员  
李涛副主任医师  
李文岗教授  
李小荣教授  
李旭副教授  
李永翔教授  
李正荣副教授  
李志霞教授  
李宗芳教授  
梁力建教授  
刘宝林教授  
刘超教授  
刘宏鸣副教授  
刘建教授  
刘亮副主任医师  
刘颖斌主任医师  
卢军华教授  
陆云飞教授  
禄韶英副教授  
吕凌副教授  
吕云福教授  
麻勇副研究员  
齐清会教授  
秦春宏副主任医师  
秦华东教授  
秦环龙教授  
秦建民主任医师  
邱伟华主任医师  
仇毓东教授  
崔清波副教授  
单云峰副主任医师  
沈柏用副教授  
施宝民教授  
施诚仁教授  
施晓雷副主任医师  
石毓君副研究员  
宋新明教授  
宋振顺教授  
孙诚谊教授  
孙文兵教授  
孙星副教授  
孙学英教授  
邵升副教授  
谭晓冬教授  
汤朝晖副主任医师  
汤绍涛教授  
唐南洪教授  
田晓峰教授

# 世界华人消化杂志®

## 编辑委员会

汪波主任医师  
汪根树副教授  
王道荣主任医师  
王德盛副主任医师  
王凤山教授  
王刚副教授  
王健生教授  
王蒙副教授  
王石林主任医师  
王文跃主任医师  
王悦华副主任医师  
王振宁教授  
王铮副教授  
王正康教授  
王志刚副主任医师  
王忠裕教授  
吴泰璜教授  
伍晓汀教授  
谢敏主任医师  
徐迅迪教授  
徐泱副教授  
许戈良教授  
许剑民教授  
薛东波教授  
杨柏霖副主任医师  
杨桦教授  
杨家和主任医师  
杨银学教授  
殷正丰教授  
于聪慧教授  
俞继卫副主任医师  
于则利教授  
禹正杨副教授  
喻春钊教授  
张必翔主任医师  
张宏伟教授  
张佳林教授  
张进祥副教授  
张俊副教授  
张力为副教授  
张伟辉主任医师  
赵刚副教授  
赵青川主任医师  
智绪亭教授  
周伟平教授  
周翔宇副主任医师  
邹小明教授

### 消化感染病学

白浪副教授  
陈国凤主任医师  
陈红松研究员  
陈建杰教授  
陈志辉副主任医师

丁惠国教授  
范建高教授  
范小玲主任医师  
范学工教授  
方今女教授  
高润平教授  
高泽立副教授  
龚国忠教授  
管世鹤副教授  
郭永红副主任医师  
胡国信主任医师  
靳雪源主任医师  
林潮双副教授  
刘正稳教授  
彭亮副主任医师  
钱林学主任医师  
孙殿兴主任医师  
谭德明教授  
汤华研究员  
王建明副教授  
王凯教授  
王怡主任医师  
吴君主任医师  
宣世英教授  
杨江华副教授  
姚鹏副教授  
张明辉副主任医师  
张占卿主任医师  
赵桂鸣主任医师  
赵秀英副教授  
周陶友副教授  
周霞秋教授  
朱传武教授  
庄林主任医师

### 消化中医药学

陈治水主任医师  
杜群研究员  
扈晓宇主任医师  
黄恒青主任医师  
李军祥教授  
李康副教授  
李晓波教授  
李勇副教授  
李振华教授  
刘成海研究员  
刘绍能主任医师  
鲁玉辉副教授  
南极星教授  
牛英才研究员  
谭周进教授  
王富春教授  
王来友副教授  
王笑民主任医师

邢建峰副教授  
徐列明教授  
许玲教授  
徐庆教授  
袁红霞研究员  
张声生教授

### 消化肿瘤学

曹秀峰教授  
曹志成院士  
代智副研究员  
侯风刚副教授  
江建新副主任医师  
蒋敬庭教授  
李瑗教授  
刘宝瑞教授  
刘炳亚研究员  
刘平教授  
刘云鹏教授  
卢宁副主任医师  
卢晓梅教授  
朴龙镇副教授  
沈克平主任医师  
王阁教授  
王锐副主任医师  
吴建兵教授  
向德兵副教授  
肖文华主任医师  
肖秀英副主任医师  
谢丹教授  
张凤春教授

### 消化影像学

白彬主任医师  
官泳松教授  
胡红杰主任医师  
李健丁教授  
龙学颖副主任医师  
倪才方教授  
魏经国教授  
肖恩华教授  
徐辉雄教授  
严惟力副教授  
杨薇副教授  
赵卫主任医师

### 消化内镜及介入治疗学

郝俊鸣副主任医师  
李家平教授  
刘杰民副主任医师  
茅爱武教授  
孙明军教授  
万军教授  
吴沛宏教授

余日胜主任医师  
袁友红副教授  
张火俊副教授

### 消化中西医结合学

范恒教授  
唐文富副教授  
王学美研究员  
魏睦新教授  
杨钦河教授  
袁建业副研究员  
张春虎副教授  
朱西杰教授

### 消化基础研究

曹洁副教授  
曹鹏副研究员  
陈敬贤教授  
陈志龙教授  
崔莲花副教授  
段义农教授  
樊红教授  
高国全教授  
高英堂研究员  
管冬元副教授  
郭长江研究员  
郭俊明教授  
何红伟副研究员  
何敏教授  
黄昆教授  
黄文林教授  
黄园教授  
洪艳教授  
李刚教授  
李君文研究员  
李孟森教授  
李文贵副教授  
李焱副研究员  
李增山副教授  
刘长征副教授  
刘克辛教授  
刘森副教授  
宁钧宇副研究员  
彭宗根副研究员  
任超世研究员  
任浩副教授  
任晓峰副教授  
邵华副主任药师  
沈东炎副教授  
沈涛副教授  
斯坎德尔·白克力教授  
台桂香教授  
谭学瑞教授  
汤静主管药师

滕旭副教授  
田文静副教授  
汪思应教授  
王钦红教授  
王书奎教授  
魏继福研究员  
文彬研究员  
吴道澄教授  
吴江锋副教授  
吴军研究员  
吴俊华副教授  
吴志强副教授  
夏敏教授

徐健副主任医师  
徐宁志研究员  
许文燮教授  
杨晓明教授  
阴赅宏研究员  
郁卫东副研究员  
喻荣彬教授  
曾柱教授  
张红教授  
张淑坤副研究员  
赵平教授  
赵铁建教授  
周南进研究员  
周素芳教授  
周晓武副主任医师  
朱益民教授  
竺亚斌研究员

### 消化病理学

陈云昭副教授  
邓昊副教授  
杜祥教授  
樊祥山副主任医师  
郭炜教授  
季菊玲副教授  
李淳副教授  
李晟磊副主任医师  
刘丽江教授  
刘勇钢副主任医师  
门秀丽教授  
莫发荣副教授  
潘兴华副主任医师  
王鲁平主任医师  
王娅兰教授  
颜宏利副教授  
于颖彦教授  
余宏宇教授  
张锦生教授  
赵春玲副教授  
朱亮副教授

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2013年1月8日 第21卷 第1期 (总第405期)

述 评	1 鹅大肠杆菌性腹泻的研究进展 刘洋, 任晓峰, 吴金花, 布日额, 薛晓阳
	6 SIRT1与肿瘤的研究进展 张广, 吴俊华
基础研究	13 阿司匹林对HT-29、SW480结肠癌细胞株CD133表达的影响 陈小燕, 廖永美, 刘胜远, 赵遼
临床研究	19 Th17细胞及其相关因子在活动期溃疡性结肠炎患者中的表达及意义 张晓斐, 蒋文瑜, 于鹏丽, 李文杰, 张红杰
焦点论坛	27 动物腹泻性疾病-现状、进展与展望 任晓峰, 陈刚, 李伟, 张阳, 吴昊, 施慈, 赵凯, 王靓靓, 李训良, 李鹏冲, 殷相平, 柳纪省, 茅翔, 范京惠, 左玉柱, 赵高伟, 仇铮, 崔尚金, 杨青
	28 猪流行性腹泻研究的进展 陈刚, 李伟, 张阳, 吴昊, 施慈, 任晓峰, 赵凯
	33 猪流行性腹泻的诊断与预防 王靓靓, 李训良, 李鹏冲, 任晓峰
	39 猪传染性胃肠炎病毒致病机制的研究进展 殷相平, 任晓峰, 柳纪省
	44 猪流行性腹泻病毒蛋白结构与功能的初探 茅翔, 任晓峰
	54 猪流行性腹泻病毒的基因结构及其诊断技术 范京惠, 左玉柱, 任晓峰
	60 轮状病毒感染机制及防治的研究进展 赵高伟, 任晓峰
	66 猪细小病毒的致病机制与防控策略 仇铮, 任晓峰, 崔尚金
	71 纳米氧化物材料在仔猪抗腹泻中的应用 杨青, 任晓峰
文献综述	75 贲门失弛缓症的研究进展 王爽, 刘冰熔
	82 挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿的应用进展 陈琴, 王晓锋, 李华山
研究快报	87 龙血素对肝星状细胞的影响 李玉莲, 宋正己, 范红, 彭伟, 高建梅, 沈涛
临床经验	93 三种消化道重建术对非肥胖性2型糖尿病患者糖脂代谢的影响 胡东平, 成晓舟, 景武堂, 赖瑞敏, 郭天康
病例报告	98 以消化系症状为首表现的系统性红斑狼疮1例 陈迪诗, 曾飞, 毛胜勋, 林静, 勒义官

<b>附 录</b>	102 《世界华人消化杂志》投稿须知 107 2013年国内国际会议预告
<b>志 谢</b>	108 志谢世界华人消化杂志编委
<b>消 息</b>	5 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版) 18 《世界华人消化杂志》外文字符标准 26 《世界华人消化杂志》修回稿须知 32 《世界华人消化杂志》栏目设置 38 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标 43 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费 53 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊 59 《世界华人消化杂志》参考文献要求 74 中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》影响因子0.873 81 《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号 92 《世界华人消化杂志》正文要求 97 中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》影响因子0.775
<b>封面故事</b>	《世界华人消化杂志》编委,任晓峰,教授,博士生导师,黑龙江省“龙江学者”奖励计划特聘教授,150030,黑龙江省哈尔滨市,东北农业大学动物医学学院预防兽医学系
<b>本期责任人</b>	编务 马帅; 送审编辑 田滢, 翟欢欢; 组版编辑 鲁亚静; 英文编辑 王天奇; 责任编辑 田滢; 形式规范审核编辑部主任 李军亮; 最终清样审核总编辑 马连生

# 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

(旬刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2013-01-08

原刊名 新消化病学杂志

### 期刊名称

世界华人消化杂志

### 国际标准连续出版物号

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

### 主编

程英升, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院影像临床医学中心

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘连新, 教授, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100016, 北京市, 清华大学第一附属医院消化医学中心

### 编辑部

李军亮, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号,

远洋国际中心D座903室

电话: 010-59080035

传真: 010-85381893

E-mail: wcjd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

### 出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Room 1701, 17/F, Henan Building,

No.90 Jaffe Road, Wanchai, Hong Kong, China

Fax: +852-31158812

Telephone: +852-58042046

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

### 制作

北京百世登生物医学科技有限公司

100025, 北京市朝阳区东四环中路62号,

远洋国际中心D座903室

电话: 010-85381892

传真: 010-85381893

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》,《中文核心期刊要目总览(2011年版)》,《Chemical Abstracts》,《EMBASE/Excerpta Medica》,《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录。

《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所,2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示,总被引频次3871次(他引率0.82),影响因子0.775,综合评价总分65.5分,分别位居内科学研究领域类52种期刊第5位、第7位和第5位,并荣获2011年度中国精品科技期刊。

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>),所有办公流程一律可以在线进行,包括投稿、审稿、编辑、审读,以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。

### 特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部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。

### 定价

每期68.00元 全年36期2448.00元

© 2013年版权归Baishideng所有

# World Chinese Journal of Digestology

## January 2013 Contents in Brief Volume 21 Number 1

<b>EDITORIAL</b>	1 Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> infection in geese <i>Liu Y, Ren XF, Wu JH, Bu RE, Xue XY</i> 6 Relationship between SIRT1 and tumors <i>Zhang G, Wu JH</i>
<b>BASIC RESEARCH</b>	13 Treatment with aspirin inhibits the expression of CD133 in human colorectal cancer cells HT-29 and SW480 <i>Chen XY, Liao YM, Liu SY, Zhao K</i>
<b>CLINICAL RESEARCH</b>	19 Significance of number of Th17 cells and expression of Th17-related cytokines in patients with active ulcerative colitis <i>Zhang XF, Jiang WY, Yu PL, Li WJ, Zhang HJ</i>
<b>TOPIC HIGHLIGHT</b>	27 Diarrheal diseases of animals: Current status and future perspectives <i>Ren XF, Chen G, Li W, Zhang Y, Wu H, Shi C, Zhao K, Wang JJ, Li XL, Li PC, Yin XP, Liu JX, Mao X, Fan JH, Zuo YZ, Zhao GW, Qiu Z, Cui SJ, Yang Q</i> 28 Progress in research of porcine epidemic diarrhea <i>Chen G, Li W, Zhang Y, Wu H, Shi C, Ren XF, Zhao K</i> 33 Diagnosis and prevention of porcine epidemic diarrhea <i>Wang JJ, Li XL, Li PC, Ren XF</i> 39 Progress in understanding pathogenic mechanisms of porcine transmissible gastroenteritis virus <i>Yin XP, Ren XF, Liu JX</i> 44 Functions of proteins of porcine epidemic diarrhea virus <i>Mao X, Ren XF</i> 54 Progress in research of genetic characteristics of porcine epidemic diarrhea virus and diagnostic methods for porcine epidemic diarrhea <i>Fan JH, Zuo YZ, Ren XF</i> 60 Rotavirus infections: mechanisms, prevention and treatment <i>Zhao GW, Ren XF</i> 66 Porcine parvovirus: Pathogenic mechanisms and preventive and control strategies <i>Qiu Z, Ren XF, Cui SJ</i> 71 Use of nano-oxide materials as anti-diarrhea agents in piglets <i>Yang Q, Ren XF</i>
<b>REVIEW</b>	75 Recent progress in treatment of achalasia <i>Wang S, Liu BR</i> 82 Progress in the use of thread-drawing therapy for perianorectal abscess <i>Chen Q, Wang XF, Li HS</i>
<b>RAPID COMMUNICATION</b>	87 Influence of treatment with loureirin on rat hepatic stellate cells <i>in vitro</i> <i>Li YL, Song ZJ, Fang H, Peng W, Gao JM, Shen T</i>
<b>CLINICAL PRACTICE</b>	93 Impact of three digestive tract reconstruction procedures on carbohydrate and lipid metabolism in non-obese patients with type 2 diabetes mellitus <i>Hu DP, Cheng XZ, Jing WT, Lai RM, Guo TK</i>

<b>CASE REPORT</b>	98 Systemic lupus erythematosus with gastrointestinal symptoms as the first manifestation: A case report <i>Chen DS, Zeng F, Mao SX, Lin J, Le YG</i>
<b>APPENDIX</b>	102 Instructions to authors of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> 107 Meeting events calendar in 2013
<b>ACKNOWLEDGMENT</b>	108 Acknowledgments to reviewers of <i>World Chinese Journal of Digestology</i>
<b>COVER</b>	Editorial Board Member of <i>World Chinese Journal of Digestology</i> , Xiao-Feng Ren, Professor, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China
<b>RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE</b>	Assistant Editor: <i>Shuai Ma</i> Review Editor: <i>Ying Tian, Huan-Huan Zhai</i> Electronic Page Editor: <i>Ya-Jing Lu</i> English Language Editor: <i>Tian-Qi Wang</i> Editor-in-Charge: <i>Ying Tian</i> Proof Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica, Abstract Journals and Digital Object Identifier

### Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993  
Renamed on January 25, 1998  
Publication date January 8, 2013

#### NAME OF JOURNAL

*World Chinese Journal of Digestology*

#### ISSN

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

#### EDITOR-IN-CHIEF

**Ying-Sheng Cheng, Professor**, Medical Imaging Center, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, 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, Hang-zhou 310006, Zhejiang Province, China

**Da-Lie Ma, Professor**, Department of Pathology,

Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, 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, Digestive Medical Center, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100016, China

#### EDITORIAL OFFICE

Jun-Liang Li, 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

Fax: +86-10-85381893

E-mail: [wjcd@wjgnet.com](mailto:wjcd@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

#### PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Co., Limited

Room 1701, 17/F, Henan Building,

No. 90 Jaffe Road, Wanchai,

Hong Kong, China

Fax: +852-31158812

Telephone: +852-58042046

E-mail: [bpg@baishideng.com](mailto:bpg@baishideng.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 68 Yuan for each issue

RMB 2448 Yuan for one year

#### COPYRIGHT

© 2013 Baishideng. 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 this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

#### 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.

# 鹅大肠杆菌性腹泻的研究进展

刘洋, 任晓峰, 吴金花, 布日额, 薛晓阳

刘洋, 吴金花, 布日额, 薛晓阳, 内蒙古民族大学生命科学院 内蒙古自治区通辽市 028000  
任晓峰, 东北农业大学动物医学学院预防兽医系 黑龙江省哈尔滨市 150030  
任晓峰, 教授, 博士生导师, 主要从事预防兽医学与分子病毒学研究。  
作者贡献分布: 本综述由刘洋、任晓峰、吴金花、布日额及薛晓阳合作完成。  
通讯作者: 布日额, 教授, 硕士生导师, 028000, 内蒙古自治区通辽市霍林河大街22号, 内蒙古民族大学生命科学院。  
wjhbrc@yahoo.com.cn  
收稿日期: 2012-09-17 修回日期: 2012-12-30  
接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-08

## Diarrheal *Escherichia coli* infection of geese

Yang Liu, Xiao-Feng Ren, Jin-Hua Wu, Ri-E Bu, Xiao-Yang Xue

Yang Liu, Jin-Hua Wu, Ri-E Bu, Xiao-Yang Xue, School of Life Sciences, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028000, Inner Mongolia Autonomous Region, China  
Xiao-Feng Ren, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China  
Correspondence to: Ri-E Bu, Professor, School of Life Sciences, Inner Mongolia University for the Nationalities, 22 Huolinhe Street, Tongliao 028000, Inner Mongolia Autonomous Region, China. wjhbrc@yahoo.com.cn  
Received: 2012-09-17 Revised: 2012-12-30  
Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-08

## Abstract

*Escherichia coli* (*E. coli*) is widely distributed in nature and is one of several types of bacteria that normally inhabit the intestinal tract of humans and most warm-blooded animals. Recent evidence indicates that many strains of *E. coli* can cause diarrhea and even death. Diarrheagenic *E. coli* can cause an acute contagious disease in geese, resulting in a decrease in egg production and even death. Geese of all ages are susceptible to this pathogen. In this review, we provide a comprehensive description of the pathogenic characteristics and virulence of diarrheagenic *E. coli* and the epidemiology, clinical features, reasonable and effective preventive measures, and rapid detection and treatment of *E. coli*-induced diarrhea in geese.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Diarrheagenic *E. coli*; Virulence etiology; Rapid diagnosis; Prevention; Treatment

Liu Y, Ren XF, Wu JH, Bu RE, Xue XY. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in geese. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 1-5

## 摘要

大肠杆菌在自然界中广泛分布, 本属于人类和大多数温血动物肠道中的正常菌群, 但是近年来, 发现许多菌株可引起腹泻, 甚至死亡。在鹅群中, 腹泻性大肠杆菌是急性接触性传染, 各种年龄的鹅均能感染, 对种鹅的危害尤其严重, 可使母鹅产蛋量下降甚至死亡, 是严重威胁到养鹅业发展。本文针对鹅致腹泻性大肠杆菌存在现状、毒力病原学特点、流行病学、临床特征等方面的综合比较, 进行分析说明, 提出合理有效的防御措施, 并且对快速检测和治疗鹅腹泻性大肠杆菌进展进行总结, 强调在禽类养殖过程中重视对大肠杆菌病的防治。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 致腹泻性大肠杆菌; 毒力病原学; 快速诊断; 预防; 治疗

刘洋, 任晓峰, 吴金花, 布日额, 薛晓阳. 鹅大肠杆菌性腹泻的研究进展. 世界华人消化杂志 2013; 21(1): 1-5  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/1.asp>

## 0 引言

目前, 养鹅业正在迅速发展, 经济效益可观, 是脱贫致富效益较高的养殖业。鹅抗病力较强, 一般很少患病, 但由于饲养管理不当, 鹅舍密集化, 已造成部分养鹅环境的恶劣。大肠杆菌普遍存在于饲料、饮水、鹅的体表、孵化场、孵化器等处, 主要通过种蛋、空气中的尘埃、污染的饲料和饮水而传播, 致腹泻性大肠杆菌又是条件性致病菌, 在环境恶劣的条件下, 极易爆发大规模的鹅疫, 造成巨大的经济损失。该病已成为鹅重要的、常见的细菌性传染病之一。目

## ■背景资料

在鹅群中, 腹泻性大肠杆菌是急性接触性传染, 对种鹅的危害尤其严重, 直接影响养鹅业的发展。本文通过对鹅致腹泻性大肠杆菌的综合比较和分析, 提出了有效的防御措施和治疗方案。

## ■同行评议者

刘森, 副教授, 安徽医科大学病原生物学



## ■ 研发前沿

目前在世界上得到公认的致泻性大肠杆菌已有5种,即致病性大肠杆菌(*entero-pathogenic E. coli*, EPEC)、产肠毒素大肠杆菌(*enterotoxigenic E. coli*, ETEC)、侵袭性大肠杆菌(*enteroinvasive E. coli*, EIEC)、肠出血性大肠杆菌(*enterohemorrhagic E. coli*, EHEC, EHEC)和肠集聚性大肠杆菌(*enteroadherent E. coli*, EAEC)<sup>[1]</sup>。这些菌均能引起人类和温血动物腹泻,当其污染食品或者水源后,可引起细菌性食物中毒和水源性腹泻,然后大规模的爆发流行,此外还可引起尿路感染、胆囊炎、肺炎等多种疾病<sup>[2]</sup>。这些群体分类是根据其基础上独特的致病因素,并且只能由这些毒力性质、临床症状、流行病学特点等因素来鉴定。因此,分析这些不同菌群的腹泻性大肠杆菌,通常首先需要确定毒力标志,进行测试<sup>[3]</sup>。只有再确定菌体后,才能根据其致病机理进行更好的诊治,达到预期的治疗效果,制止鹅疫的发展,及时挽回养殖者的经济损失。本文因此对鹅致腹泻性大肠杆菌存在现状、毒力病原学特点、流行病学和临床特征等方面进行综述,通过对该病的深入了解,才能更好的防治腹泻性大肠杆菌,防患于未然。

前在世界上得到公认的致泻性大肠杆菌已有5种,即致病性大肠杆菌(*entero-pathogenic E. coli*, EPEC)、产肠毒素大肠杆菌(*enterotoxigenic E. coli*, ETEC)、侵袭性大肠杆菌(*enteroinvasive E. coli*, EIEC)、肠出血性大肠杆菌(*enterohemorrhagic E. coli*, EHEC, EHEC)和肠集聚性大肠杆菌(*enteroadherent E. coli*, EAEC)<sup>[1]</sup>。这些菌均能引起人类和温血动物腹泻,当其污染食品或者水源后,可引起细菌性食物中毒和水源性腹泻,然后大规模的爆发流行,此外还可引起尿路感染、胆囊炎、肺炎等多种疾病<sup>[2]</sup>。这些群体分类是根据其基础上独特的致病因素,并且只能由这些毒力性质、临床症状、流行病学特点等因素来鉴定。因此,分析这些不同菌群的腹泻性大肠杆菌,通常首先需要确定毒力标志,进行测试<sup>[3]</sup>。只有再确定菌体后,才能根据其致病机理进行更好的诊治,达到预期的治疗效果,制止鹅疫的发展,及时挽回养殖者的经济损失。本文因此对鹅致腹泻性大肠杆菌存在现状、毒力病原学特点、流行病学和临床特征等方面进行综述,通过对该病的深入了解,才能更好的防治腹泻性大肠杆菌,防患于未然。

## 1 各类腹泻性大肠杆菌毒力病原学特点

1.1 致病性大肠杆菌 国外曾报道,因EPEC而引起过胃肠炎的食物源性和水源性爆发流行。饲养人员污染饲料或者粪便污染水源是主要原因。该菌致病性涉及到EAE基因编码的蛋白,导致病变,同时也涉及到质粒编码的蛋白质,称为EPEC黏附因子,使细菌黏附于肠细胞。EPEC黏附因子的产生可以通过检测该菌是否含有Hep-2细胞和EAE基因来判定,还可以通过PCR检测断定<sup>[4]</sup>。这种紧密黏连与糖蛋白复合物溶解、微绒毛破坏萎缩、黏膜变薄、固有层化脓性感染以及腺管细胞增生有关。黏膜的改变与黏膜刷状缘上酶的减少,致使吸收功能损伤,导致腹泻<sup>[5]</sup>。

1.2 产肠毒素大肠杆菌 通常发生在发达的国家,ETEC的感染途径主要是由于污染的饲料和饮用水引起的,临床表现以水样性腹泻为主。发生机制是产生了多种肠毒素,能产生不耐热肠毒素(LT)、霍乱毒素(CT)和热稳定毒素(ST)<sup>[6]</sup>。其中ST有几个变种,其中STa是在人或动物中分离到的,STb只在人类中才能分离到<sup>[7]</sup>。产生的这些肠毒素中,LT可以激活细胞的腺苷酸环化酶,STa则激活鸟苷酸环化酶<sup>[8]</sup>,导致腺苷-3',5'-环化一磷酸和环磷酸鸟苷积聚,进而引起肠液过

度的分泌,引起水样腹泻。而STb并非是通过激活腺苷酸和鸟氨酸酶系统,就可引起肠液分泌增加产生腹泻现象<sup>[9]</sup>。

1.3 侵袭性大肠杆菌 EIEC可引起类似像痢疾杆菌的腹泻形式,主要感染人类,也是可以通过食物和饮水来进行传播,感染后典型现象是化脓性结肠炎,里急后重,血性或痢疾样腹泻<sup>[10]</sup>。EIEC具有非能动性,不发酵乳糖<sup>[11]</sup>。他是入侵性的杆菌,致病性主要因为侵犯肠黏膜上皮细胞并在细胞内繁殖,直接破坏肠组织能力,导致急性黏膜和黏膜下层化脓性感染并伴有溃疡所引起的腹泻<sup>[12]</sup>。

1.4 出血性大肠杆菌 EHEC可导致血性肠炎及血性腹泻,他是溶血性尿毒中和症的主要原因。O157:H7是这类病菌的主要菌株<sup>[13]</sup>,自1982年在美国首次发现后,先后发生多次大规模的爆发,我国也在1987年发现第一株EHEC,主要途径也是通过食物和水源传播,母鹅生蛋后,蛋壳上携带的病菌也可以进行传播<sup>[14]</sup>。感染出血性大肠杆菌,会出现腹泻,便血等症状,一般雏鹅最易感染。EHEC主要是因为志贺样毒素的产生达到致病效果,这类毒素呈细胞毒性,有很多变种存在,全球性疾病很多都与该毒素有关<sup>[15]</sup>。志贺样毒素进入血液后可破坏血细胞和血小板,导致出血,随后作用于结肠,定居肠道内,引起肠黏膜症,随后患者出现腹泻、便血、水肿等典型症状<sup>[16]</sup>。

1.5 集聚性大肠杆菌 1985年发现首例EAEC,对人类和动物都有致腹泻的作用,并且伴有便血、呕吐等症状,病程时间较长,在发展中国家发病率较高。但是至今EAEC的致病机制尚不是十分清楚,很多专家认为可能与细胞黏附定居,毒力因子作用等因素有关,所以EAEC仍是盲区,很多问题需要去研究解决<sup>[17]</sup>。

## 2 流行病学特点

大肠杆菌是自然界分布最广的细菌,致病性大肠杆菌可引起急性传染病。传染源主要是病鹅和带菌鹅,传播途径主要是通过食物和饮水污染,还有饲养场和饲养工具等多方面因素<sup>[18]</sup>。本病主要通过消化道进入鹅体内,雏鹅感染一般都种蛋有关,而成年母鹅感染后,产蛋高峰期发病最多,产蛋量下降,严重导致种鹅大批量的死亡,公鹅感染后虽然死亡率没有母鹅高,但是可通过配种传播此病。当患畜的机体免疫力降低或者患有其他疾病的时候,最易使体内潜藏的致腹泻性大肠杆菌趁虚而入,进入肠道和

## ■ 创新盘点

本文分析不同菌群的腹泻性大肠杆菌,确定毒力标志,根据其致病机制,提出致病防治方案,并且对该病的流行病学和临床特征等方面都有很强的综合性总结比较,这是之前该领域报道中不曾有过的,让读者对鹅大肠杆菌性腹泻有更全面的认知。

血管, 分布全身. 本病的发生多与饲养环境恶劣, 饲养管理疏忽有关. 种鹅经过长途运输, 车内空间狭窄, 鹅群过度拥挤, 闷热, 缺水; 应激反应, 天气寒冷, 温度突然变化; 鹅群体过密, 鹅舍内通风不良, 污秽潮湿; 饲养管理不当, 水源受到污染, 饲料发霉变质; 饲料配方营养不全, 维生素缺乏等均会导致本病的发生. 尽管有报道表明该病在发达国家中爆发率大于发展中国家, 但是近几年来发展中国家发病率直线上升<sup>[19]</sup>. 因此我国必须对此病提高警惕, 以防止对我国养鹅业造成影响.

### 3 临床特征

患病鹅首先体温升高、精神沉郁、昏睡、采食减少或不食、饮水增加、腹泻、粪便恶臭并带有白色黏液或混有血丝或气泡, 肛门周围沾污粪便, 呼吸困难, 最后窒息死亡. 母鹅产软壳蛋, 产蛋率下降, 在产蛋后不久, 部分母鹅精神不振, 食欲减退, 不愿走动, 经常离群独处或在水面漂浮, 呼吸困难, 站立不稳, 头向下弯曲嘴能触及地面, 排黄白色稀便, 肛门周围沾有污秽发臭的排泄物, 其中混有蛋清, 凝固的蛋白, 消瘦, 呈现脱水症状, 最后因体力衰竭而死亡, 即使有少数鹅能康复, 也不能恢复产蛋<sup>[20]</sup>. 公鹅患该病后, 主要是性生殖器官病, 表现阴茎红肿、溃疡或结节, 病情严重者阴茎表面布满绿豆大小的坏死灶, 剥去痴块即露出溃疡灶, 阴茎无法收回, 丧失交配能力.

### 4 检测方法

由于致腹泻性大肠杆菌的血清型很多, 因此, 针对检测的方法也有很多, 例如针对EPEC, 他分泌的毒素LT可以通过肾上腺皮质细胞检测或乳胶凝集试验和酶联免疫吸附试验检测到<sup>[21]</sup>, ST的产生也可以用ELISA法检测到. LT和ST的基因已经被测序, 利用PCR和基因探针也是常用的检验方法. EIEC可以检测入侵的HeLa或Hep-2, 还可通过细胞组织培养和PCR以及入侵基因探针来确定. EPEC可以证明Hep-2细胞和EAE基因的存在来确定该菌株, 也可以通过PCR检测<sup>[22]</sup>. EHEC不发酵山梨醇或者发酵十分缓慢, 不具有葡萄糖醛酸酶的活性, 因此, 这些特性经常被用来从食物中分离这种病菌, 使用ELISA毒性实验或者基因探针, 利用出血性大肠杆菌标记特定的PCR检测也可以<sup>[23]</sup>. 但是这些过程往往需要增菌, 生化管发酵, 药敏试验等鉴定, 最后还要经过血清学的鉴定, 时间较长<sup>[24]</sup>. 免疫珠法是近年来发展的

一项细胞免疫分离检测技术, 它具有免疫反应高度保守性和固相化试剂的优势, 已在免疫检测、免疫吸附、细胞分离和培养上获得了较好的成绩<sup>[25]</sup>. 利用免疫吸附原理制备吸附有腹泻性大肠杆菌诊断血清的免疫珠<sup>[26]</sup>, 再根据特异性血清学反应, 分离出腹泻性大肠杆菌<sup>[27]</sup>. 利用大肠杆菌能发酵乳糖产酸产气这一特征进行鉴定<sup>[28]</sup>, 能在18 h内快速检测出致腹泻病性大肠杆菌. 该方法简单, 操作方便, 灵敏度高, 可测出样液中含有>10 CFU/mL 数的腹泻性大肠杆菌<sup>[29]</sup>.

### 5 防治措施

5.1 致腹泻性大肠杆菌的防治 对致腹泻性大肠杆菌防治问题, 首先应重视种蛋间的细菌传播. 改善饲养环境, 保持鹅舍的清洁, 对鹅接触的用具、设备和鹅舍、道路等用百毒杀溶液喷雾消毒. 饲料中添加微量元素及维生素, 增强应激和抗病能力<sup>[30]</sup>. 保持鸭舍通风良好, 饲养密度要适宜, 坚持全进全出制度, 适时淘汰病弱残, 如发现患病鹅, 应与健康的鹅群及时隔离.

5.2 免疫接种 由于各地鹅源致病性大肠杆菌血清型差异很大, 通过分离当地流行菌株, 筛选免疫源性较好的菌株制备灭活疫苗是预防本病的有效途径<sup>[31]</sup>. 母鹅产蛋前15 d, 每只肌肉注射1 mL, 然后将其所产的蛋留做种用. 雏鹅7-10 d接种, 每只皮下注射0.5 mL. 鹅大肠杆菌性生殖器官病已研制成菌苗, 公鹅在本病的传播上也起着重要的作用, 因此对公鹅也应提早注射性生殖器官病疫苗, 防止在配种时候传播疾病.

5.3 药物治疗 致病性大肠杆菌易产生耐药性, 治疗需在患病的早期进行磺胺类抗生素类和呋喃类药物进行治疗本病, 均有良效<sup>[32]</sup>. 但须注意鹅场常用某种药物作为饲料添加剂, 而使一些菌株产生耐药性的问题<sup>[33]</sup>. 饲料中还可添加多维生素和微量元素, 以提高鹅体的抗病能力, 还可添加大蒜素, 改变肠道环境, 增加肠道有益菌<sup>[34]</sup>. 在我国根据中兽医辩证施治, 鹅的大肠杆菌属于病毒内侵, 血瘀气滞. 治宜清热解毒, 活血散瘀. 方用五味消毒法治疗, 既黄芩、连翘、金银花、菊花、紫花地丁, 疗效也很显著<sup>[35]</sup>. 对发病严重的地区, 可采取有针对性的自家苗进行预防, 尽量少用或不用抗生素, 为百姓提供更多的绿色食品.

### 6 结论

近年来随着养鹅业的兴起, 也随之带来了许多鹅高度传染病的爆发流行, 造成养鹅者经济效

#### ■应用要点

本文对鹅致腹泻性大肠杆菌存在现状、毒力病原学特点、流行病学和临床特征等方面进行综述, 通过对该病的深入了解, 才能更好的防治腹泻性大肠杆菌, 防患于未然, 挽回养殖户者的经济损失.

### ■名词解释

**鸟苷酸环化酶(GC):** 可将三磷酸鸟苷催化为环磷酸鸟苷。其中, 与膜受体结合的鸟苷酸环化酶和可以在膜受体与肽类激素(如心房钠利尿肽)结合后被激活。而胞质中的游离鸟苷酸环化酶可被NO激活进而合成环磷酸鸟苷;

**EAE基因:** 位于LEE致病岛编码一个94-97 kDa被称为紧密素的外膜蛋白, 紧密素属于细胞黏附分子家族, 可介导细菌与肠上皮细胞紧密黏附, 是EPEC在肠道黏膜定居并引起A/E损伤所必须的;

**腺苷-3',5'-环化一磷酸:** 一种环状核苷酸, 简称为cAMP, 是由三磷酸腺苷(ATP)脱掉两个磷酸缩合而成的。以微量存在于动植物细胞和微生物中。体内多种激素作用于细胞时, 可促使细胞生成此物, 转而调节细胞的生理活动与物质代谢。

益下降, 所以国内外许多畜牧专家都对鹅传染病进入深入研究, 其中鹅致腹泻性大肠杆菌, 可导致20%的鹅快速死亡, 国内外对该病已经有很多例报道。所以首先预防是关键, 饲料和水源污染是阻止腹泻性大肠杆菌流行的重要环节。其次是检测和治疗, ETEC是我国致腹泻性大肠杆菌的主要病原菌型, 所以应加强对该病原菌的研究和治疗。我国对该菌的鉴定主要是靠生化反应和血清学方法, 这主要是因为其由一些优势血清型构成, 只有在少数实验室才能进行毒素等检测。不过有相关报道我国会陆续将较先进的测试理念和仪器投入到检测机关, 更加完善检测系统。通过本文对鹅致腹泻性大肠杆菌的总结, 希望能给饲养管理者带来一定的指导意义, 提高对鹅养殖业的重视, 提前做好预防工作, 同时也为研究致腹泻性大肠杆菌的学者们提供一定的参考。

## 7 参考文献

- Estrada-Garcia T, Lopez-Saucedo C, Thompson-Bonilla R, Abonce M, Lopez-Hernandez D, Santos JI, Rosado JL, DuPont HL, Long KZ. Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 93-98 [PMID: 19020055 DOI: 10.1128/JCM.01166-08]
- 郁庆福. 现代卫生微生物学. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 36-37
- 黄宗梅, 陈红英, 崔沛. 60株大肠杆菌的分离与致病性鉴定. *中国畜牧兽医* 2011; 38: 217-219
- Lim YS, Ngan CC, Tay L. Enteropathogenic *Escherichia coli* as a cause of diarrhoea among children in Singapore. *J Trop Med Hyg* 1992; 95: 339-342 [PMID: 1404557]
- 徐文杰, 戴峰, 张娟. 致腹泻性大肠杆菌病原学调查. *中国卫生检验杂志* 1999; 9: 294-295
- Kansal R, Rasko DA, Sahl JW, Munson GP, Roy K, Luo Q, Sheikh A, Kuhne KJ, Fleckenstein JM. Transcriptional Modulation of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Virulence Genes in Response to Epithelial Cell Interactions. *Infect Immun* 2013; 81: 259-270 [PMID: 23115039 DOI: 10.1128/IAI.00919-12]
- Behiry IK, Abada EA, Ahmed EA, Labeeb RS. Enteropathogenic *Escherichia coli* associated with diarrhea in children in Cairo, Egypt. *ScientificWorld-Journal* 2011; 11: 2613-2619 [PMID: 22262949 DOI: 10.1100/2011/485381]
- Vanderkelen L, Van Herreweghe JM, Callewaert L, Michiels CW. Goose-type lysozyme inhibitor (PliG) enhances survival of *Escherichia coli* in goose egg albumen. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 4697-4699 [PMID: 21602367 DOI: 10.1128/AEM.00427-11]
- Onnberg A, Mölling P, Zimmermann J, Söderquist B. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases with focus on CTX-M in a low-endemic area in Sweden. *APMIS* 2011; 119: 287-295 [PMID: 21492229 DOI: 10.1111/

- j.1600-0463.2011.02730.x]
- Vieira N, Bates SJ, Solberg OD, Ponce K, Howsmo R, Cevallos W, Trueba G, Riley L, Eisenberg JN. High prevalence of enteroinvasive *Escherichia coli* isolated in a remote region of northern coastal Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76: 528-533 [PMID: 17360879]
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing document M100-S19, CLSI, Wayne. pp. 52, 2009
- van den Beld MJ, Reubsaet FA. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 899-904 [PMID: 21901636 DOI: 10.1007/s10096-011-1395-7]
- Jokinen C, Edge TA, Ho S, Koning W, Laing C, Mauro W, Medeiros D, Miller J, Robertson W, Taboada E, Thomas JE, Topp E, Ziebell K, Gannon VP. Molecular subtypes of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157: H7 isolated from faecal and surface water samples in the Oldman River watershed, Alberta, Canada. *Water Res* 2011; 45: 1247-1257 [PMID: 20971491 DOI: 10.1016/j.watres.2010.10.001]
- Srinivasan V, Nguyen LT, Headrick SI, Murinda SE, Oliver SP. Antimicrobial resistance patterns of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 and O157: H7- from different origins. *Microb Drug Resist* 2007; 13: 44-51 [PMID: 17536933 DOI: 10.1089/mdr.2006.9996]
- 徐建国. 一种新的腹泻病原-肠产志贺毒素且具侵袭力的大肠杆菌. *中华流行病学杂志* 1994; 15: 205
- Mandomando I, Jaintilal D, Pons MJ, Vallès X, Espasa M, Mensa L, Sigauque B, Sanz S, Sacarlal J, Macete E, Abacassamo F, Alonso PL, Ruiz J. Antimicrobial susceptibility and mechanisms of resistance in *Shigella* and *Salmonella* isolates from children under five years of age with diarrhea in rural Mozambique. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 2450-2454 [PMID: 19332670 DOI: 10.1128/AAC.01282-08]
- 欧阳颖. 致腹泻性大肠杆菌感染. *当代医师杂志* 1996; 1: 3-4
- 张明. 鹅大肠杆菌病的防治措施. *畜牧兽医科技信息* 2012; 19: 98
- 王洪君, 高继新. 鹅大肠杆菌病的诊治. *吉林农业* 2011; (6): 257
- 郑丽. 浅谈鹅大肠杆菌病的防控措施. *中国畜禽种业* 2010; 6: 141
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-976 [PMID: 19995920 DOI: 10.1128/AAC.01009-09]
- Green HC, Dick LK, Gilpin B, Samadpour M, Field KG. Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 503-510 [PMID: 22081573 DOI: 10.1128/AEM.05734-11]
- 陈绍红, 刘艳芬, 马龙, 刘轴. 源致病性大肠杆菌 O<sub>157</sub>(H7)K<sub>121</sub>(H7)和 O<sub>157</sub>(H7)K<sub>121</sub>(H7)亚型的分离与鉴定. *中国畜牧兽医* 2010; 37: 75-78
- 钱丽萍. 鹅大肠杆菌的诊断与药敏选择. *中国畜禽种业* 2011; 7: 148-149
- de Boer E, Beumer RR. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int J Food*

- Microbiol* 1999; 50: 119-130 [PMID: 10488848 DOI: 10.1016/S0168-1605(99)00081-1]
- 26 徐宜为. 免疫检测技术. 北京: 科学出版社, 1997: 290-301
- 27 Bouvrette P, Luong JH. Development of a flow injection analysis (FIA) immunosensor for the detection of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 1995; 27: 129-137 [PMID: 8579984 DOI: 10.1016/0168-1605(94)00157-2]
- 28 Colquhoun KO, Timms S, Fricker CR. Detection of *Escherichia coli* in potable water using direct impedance technology. *J Appl Bacteriol* 1995; 79: 635-639 [PMID: 8557618 DOI: 10.1111/j.1365-2672.1995.tb00948.x]
- 29 Meerburg BG, Koene MG, Kleijn D. *Escherichia coli* concentrations in feces of geese, coots, and gulls residing on recreational water in The Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 601-603 [PMID: 21548761 DOI: 10.1089/vbz.2010.0218]
- 30 Silva-Sanchez J, Barrios H, Reyna-Flores F, Bello-Diaz M, Sanchez-Perez A, Rojas T, Garza-Ramos U. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in Mexico. *Microb Drug Resist* 2011; 17: 497-505 [PMID: 21834663 DOI: 10.1089/mdr.2011.0086]
- 31 陈育峰, 刘艳芬, 陈绍, 红刘铀. 鹅大肠杆菌油佐剂灭活疫苗的研制. *中国畜牧兽医* 2011; 38: 100-102
- 32 Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem* 2009; 16: 1028-1046 [PMID: 19275610 DOI: 10.2174/092986709787581879]
- 33 Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 260-271 [PMID: 20208551]
- 34 Smith KE, Wilker PR, Reiter PL, Hedican EB, Bender JB, Hedberg CW. Antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157 infection and the risk of hemolytic uremic syndrome, Minnesota. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31: 37-41 [PMID: 21892124 DOI: 10.1097/INF.0b013e31823096a8]
- 35 程汉. 雏鹅大肠杆菌病的中药治疗. *湖北畜牧兽医* 2009; 16: 31

#### ■同行评价

本文选题新颖, 文章结构合理, 语言文字流畅, 论述较深刻, 内容丰富, 分层次对鹅致腹泻性大肠杆菌存在现状、毒力病原学特点、流行病学、临床特征及快速检测和治疗进展进行总结, 对鹅大肠杆菌性腹泻研究有重要意义, 故有一定学术价值。

编辑 李军亮 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

#### •消息•

### 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》(2011年版)

本刊讯 依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《世界华人消化杂志》再次入选《中文核心期刊要目总览》2011年版(即第六版)核心期刊。

对于核心期刊的评价仍采用定量评价和定性评审相结合的方法。定量评价指标体系采用了被引量、被引量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达到60余种, 统计到的文献数量共计221177余万篇次, 涉及期刊14400余种。参加核心期刊评审的学科专家达8200多位。经过定量筛选和专家定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1982种核心期刊。

《世界华人消化杂志》在编委、作者和读者的支持下, 期刊学术水平稳步提升, 编校质量稳定, 再次被北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2011年版)收录。在此, 向关心、支持《世界华人消化杂志》的编委、作者和读者, 表示衷心的感谢! (编辑部主任: 李军亮 2012-03-08)。

# SIRT1与肿瘤的研究进展

张广, 吴俊华

## ■背景资料

关于肿瘤起源、发展、侵袭、耐药等方面的问题一直是研究的热点。多种肿瘤细胞中的长寿基因SIRT1过表达引起人们的关注, 认为这一与长寿关系密切的脱乙酰基酶在肿瘤的各种特性中起到至关重要的作用。

张广, 吴俊华, 南京大学医学院 江苏省南京市 210093  
张广, 主要从事新型抗肝癌化合物的发现与作用机制的研究。  
作者贡献分布: 本文综述由张广完成; 吴俊华审校。  
通讯作者: 吴俊华, 副教授, 210093, 江苏省南京市鼓楼区汉口路22号, 南京大学医学院. wujunhua@nju.edu.cn  
电话: 025-83593192  
收稿日期: 2012-08-23 修回日期: 2012-11-23  
接受日期: 2012-12-03 在线出版日期: 2013-01-08

## Relationship between SIRT1 and tumors

Guang Zhang, Jun-Hua Wu

Guang Zhang, Jun-Hua Wu, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu Province, China  
Correspondence to: Jun-Hua Wu, Associate Professor, School of Medicine, Nanjing University, 22 Hankou Road, Gulou District, Nanjing 210093, Jiangsu Province, China. wujunhua@nju.edu.cn  
Received: 2012-08-23 Revised: 2012-11-23  
Accepted: 2012-12-03 Published online: 2013-01-08

## Abstract

Tumorigenesis is closely related to overexpression of oncogenes and/or down-expression of tumor suppressor genes. Gene expression and deacetylase activity of SIRT1, a class III histone deacetylase, are up-regulated in tumor cells, which suggests that SIRT1 may be involved in tumorigenesis. SIRT1 may induce deacetylation of tumor suppressor proteins to promote tumorigenesis. SIRT1 promotes tumor occurrence, development, and maintenance of various characteristics possibly by promoting cell proliferation, inhibiting apoptosis, and preventing senescence. On the other hand, SIRT1 can also deacetylate tumor inducers to inhibit tumorigenesis. Therefore, further investigation of the role of SIRT1 in tumorigenesis is of great importance, and SIRT1 may be used as a therapeutic target for tumors.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: SIRT1; Tumors

Zhang G, Wu JH. Relationship between SIRT1 and tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 6-12

## 摘要

肿瘤的发生与癌基因的过表达或者抑癌基因的低表达密切相关。III型组蛋白脱乙酰酶SIRT1的基因表达和脱乙酰酶活性在肿瘤细胞中均发生上调, 由此推测这些也许导致了肿瘤的发生。SIRT1也能够引起肿瘤抑制因子的脱乙酰化从而促进肿瘤发生。在肿瘤的发生、发展、各种特性维持中, SIRT1因其能够促进肿瘤细胞增殖、抑制凋亡、衰老等活性很可能扮演着重要角色。然而, 另一方面, SIRT1也能够脱乙酰化肿瘤促进因子而起到抑制肿瘤作用。SIRT1在肿瘤的发生过程中扮演的角色存在争议。因此, 对SIRT1进行进一步研究就显得尤为重要, 而其作为肿瘤治疗靶点的可能性使得研究更具临床意义。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: SIRT1; 肿瘤

张广, 吴俊华. SIRT1与肿瘤的研究进展. 世界华人消化杂志 2013; 21(1): 6-12  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/6.asp>

## 0 引言

肿瘤的形成是一个复杂的过程, 在这一过程中, 正常细胞转变成为肿瘤细胞, 即所谓的恶变。在细胞恶变过程中, 在细胞水平及基因水平逐渐发生变化, 并最终演变成生长及分化都不可控制的肿瘤细胞<sup>[1,2]</sup>。通常能够编码那些在肿瘤形成中起到促进作用蛋白的基因被称之为癌基因, 而抑癌基因则是那些能够编码抑制肿瘤蛋白的基因。癌基因与抑癌基因都因其在肿瘤形成过程中扮演重要角色而被人们广泛研究。在所有肿瘤中, 消化系肿瘤以其高发生率、易转移、发现晚、预后差等为人们重视。其中, 胃癌、肝癌、肠癌发生率分别占我国人群肿瘤发生的第1、3、4位, 胰腺癌、胆囊癌等虽然发生率较低, 但预后极差, 因此从癌基因与抑癌基因角度对消化系统肿瘤的深入研究显得愈发重要。在过去的十余年间, SIRT1因其在肿瘤形成过程

## ■同行评议者

陈洪, 主任医师, 副教授, 东南大学附属中大医院消化科

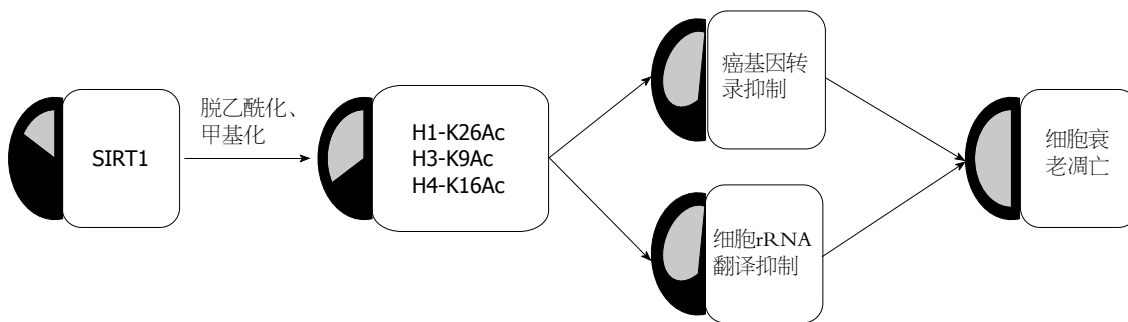


图 1 SIRT1的生理学作用.

**■ 相关报道**  
有报道SIRT1在胃癌、前列腺癌、肝癌、血液肿瘤中均明显上调, 并且SIRT1水平与肿瘤分期、预后密切相关, 后期的进一步研究发现, SIRT1还通过其脱乙酰基作用调控着诸多与肿瘤关系密切的信号因子, 进而影响着肿瘤的各种特性.

中扮演的重要角色而被人们不断研究<sup>[3-6]</sup>. SIRT1是sirtuin家族中组蛋白3的脱乙酰基酶, 他是酵母沉默信号调节因子2(silencing information regulator 2, sir2)在人体中的类似物. sirtuin蛋白广泛分布于细胞内外, 对诸多正常的生理学过程起到调节作用. 这些生理学过程包括: 细胞增殖、炎症反应、新陈代谢(包括ATP生成、胰岛素分泌和尿素循环)等<sup>[7-11]</sup>. 关于SIRT蛋白在细胞中的分布和功能的详细信息见图1<sup>[7-11]</sup>. 在SIRT的7个成员当中, SIRT1在总的DNA及氨基酸序列方面是最大的, 同时针对SIRT1的研究也最多. SIRT1在肿瘤形成过程中既有癌基因也有抑癌基因的作用, 可以说SIRT1对癌基因与抑癌基因的平衡关系是起到重要作用的. 随着对SIRT1研究的不断深入, 其在消化系肿瘤中所扮演的角色也逐渐被人们认识并争论, 以SIRT1作为靶点, 为消化系肿瘤的治疗提供了新的途径, 并且正逐渐成为研究热点. 因此, 本文综述了SIRT1在肿瘤发生、发展等过程中的争议性角色, 并着重探讨了SIRT1在消化系肿瘤中的作用, 以期为以SIRT1作为消化系肿瘤治疗靶点的研究做好铺垫.

### 1 SIRT1的生理学作用

**1.1 SIRT1通过脱乙酰基及甲基化修饰作用调节组蛋白** SIRT1通过与转录因子、共调节子相互作用而被募集到染色体周围. 在细胞核中, SIRT1对相关组蛋白特定部位赖氨酸起脱乙酰基作用, 这些组蛋白包括: H1组蛋白26位点赖氨酸(H1-K26Ac)、H3组蛋白9位点赖氨酸(H3-K9Ac)和H4组蛋白16位点赖氨酸(H4-K16Ac)<sup>[12,13]</sup>. 同时SIRT1还是组蛋白修饰酶的调控因子. SIRT1能够通过组蛋白乙酰转移酶P300的结合而对其起抑制作用, 进而间接促进组蛋白的低乙酰化.

SIRT1对组蛋白的脱乙酰基作用与其促进

组蛋白甲基化作用相辅相成. SIRT1能够募集组蛋白甲基转移酶SUV39H1并对其起到脱乙酰作用, 进而增进其甲基转移酶的活性, 这样一来, 增加了SIRT1的靶向位点-H3K9me3<sup>[14]</sup>. 另外, 通过与另一组蛋白甲基转移酶(Ezh2)的局部化作用, SIRT1间接的调控了H3K27和H1K26的甲基化<sup>[15,16]</sup>.

**1.2 SIRT1通过对非组蛋白的脱乙酰作用来调控众多基因的表达** SIRT1通过修饰非组蛋白来调控众多基因的表达情况. SIRT1能够调控的非组蛋白主要包括: (1)转录因子: p53、FOXO蛋白、E2F1、HIC1、BCL6、TAF68、Rb、PGC18、过氧化物酶增殖活化因子γ、P73、雄激素受体、NF-κB、心肌细胞增强因子2、MyoD、HDAC4等; (2)DNA修复蛋白: 包括Ku70与MRE11-RAD50-NBS1(MRN); (3)信号因子: 内皮一氧化氮合成酶与Smad7<sup>[17-19]</sup>.

**1.3 SIRT1对DNA的甲基化作用** SIRT1除了能够甲基化组蛋白, 他还对DNA同样起到甲基化的作用. 有报道称, 在肿瘤细胞中, SIRT1能够定位于抑癌基因的启动子区域, 进而通过超甲基化作用该区域. 而抑制SIRT1的活性, 能够逆转超甲基化作用对这些抑癌基因的抑制<sup>[20]</sup>. 在上皮肿瘤形成、发展、转移过程中常常被抑制的抑癌基因CDH1就是一种能被SIRT1抑制的抑癌基因. 此外, SIRT1介导的这种转变还抑制了包括: 转录因子P27、GATA4、GATA5、分泌性卷曲相关蛋白和错配修复基因MLH1<sup>[20]</sup>.

### 2 SIRT1在肿瘤形成中的双重作用

**2.1 SIRT1作为潜在的肿瘤促进因子** 肿瘤组织及肿瘤细胞中甚至在鼠类的肿瘤中SIRT1的过表达, 自然而然让人们猜测SIRT1是肿瘤促进因子<sup>[21-23]</sup>. 有研究报道, SIRT1在人前列腺癌、人原发性结肠癌、急性髓细胞性白血病中均明显过表达<sup>[24-26]</sup>. 此外, SIRT1在人鳞状上皮细胞癌、基底

### ■ 创新盘点

本文以一种全新的思维,即列举多种消化系统肿瘤中SIRT1作为癌基因/抑癌基因被研究并争论,进而发现SIRT1的研究、应用价值。

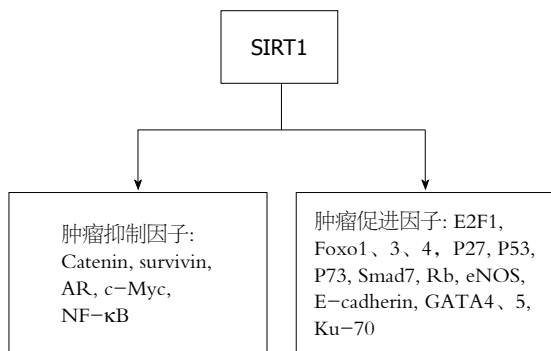


图 2 SIRT1对癌基因/抑癌基因的作用。

细胞癌中也高表达<sup>[27]</sup>。Ford等<sup>[28]</sup>通过沉默SIRT1,能够导致人上皮细胞癌细胞的生长停滞与凋亡。相比之下,正常的人上皮细胞及二倍体成纤维细胞对SIRT1的沉默表现出良好的抗性。Heltweg等<sup>[18]</sup>报道在基因毒性应激期间使用cambinol抑制SIRT1的活性,能够导致关键应激反应蛋白的超乙酰化,进而导致细胞周期停滞。使用cambinol作用于BCL6表达的Brucitt淋巴瘤细胞能够导致细胞凋亡,这一凋亡过程被认为与BCL6及P53的超乙酰化相关。Liang等<sup>[30]</sup>报道通过使用一种siRNA降低SIRT1水平,能够将一种肝癌顺铂耐药细胞的药物敏感程度提高20倍。通过cDNA转染能够在普通肝癌顺铂敏感细胞中增加顺铂耐药程度达2-3倍。Chen等<sup>[30]</sup>通过研究多例肝癌标本发现,SIRT1表达水平与肝癌化疗耐药呈正相关,另外通过统计学分析,还得出结论,SIRT1在肝癌中表达情况与肝癌的预后呈正相关。因此,过表达SIRT1进而上调SIRT1功能能够阻止肿瘤细胞的凋亡并降低肿瘤细胞对一些抗肿瘤药物的敏感性。相对地,降低SIRT1功能能够得到相反的作用。此外,SIRT1能够使P53、FOXO脱乙酰基,进而阻断了P53、FOXO依赖的转录及凋亡作用<sup>[30,31]</sup>。

诸多临床病理研究与细胞系SIRT1水平的研究表明,SIRT1水平往往与肿瘤转移、侵袭及其他生物学特性相关,并最终与患者的预后相关。Lee等<sup>[32]</sup>通过统计多例乳腺癌患者的SIRT1与DBC1水平与患者预后发现,SIRT1与DBC1水平与患者手术术后的预后密切相关。同样的,Elangovan等<sup>[33]</sup>的研究也表明,SIRT1在乳腺癌形成中起到了重要作用。在胃癌中,同样的方法也显示SIRT1与肿瘤分期、患者预后密切相关<sup>[34]</sup>。Chen等<sup>[30]</sup>研究发现,在肝癌中SIRT1也同样扮演相同的角色,而且SIRT1促进了化疗耐药。另外Wang等<sup>[35]</sup>还发现,SIRT1是通过PI3K/PTE/AKT途径促进肝癌的

发生。此外,在胰腺癌、前列腺癌、神经胶质瘤中均发现,SIRT1与肿瘤的发生关系密切,通过不同手段影响SIRT1水平与功能,显著影响了肿瘤细胞的凋亡、转移、侵袭。

SIRT1对肿瘤的生物学特性有一定影响。抑制SIRT1除了能够影响肿瘤细胞的凋亡,还影响了肿瘤细胞的增殖、转移、侵袭等特性。Nakane等<sup>[36]</sup>在使用siRNA敲除前列腺癌细胞中SIRT1后发现,肿瘤的转移、侵袭能力明显受到影响。Liu等<sup>[13]</sup>研究miR-520与miR-373对纤维母细胞瘤的转移、侵袭能力影响,发现miR-520与miR-373时通过影响SIRT1进而影响了Ras/Raf/MEK/Erk通路与NF-κB来影响的肿瘤转移、侵袭。

遗传工程小鼠为评价基因体内功能提供了有力的途径。然而由于SIRT1阴性胚胎的致死率较高,SIRT1在肿瘤形成中的作用并不能通过这一方法来检验<sup>[37,38]</sup>。由于DNA损伤修复及组蛋白修饰功能受到抑制,SIRT1阴性的鼠胚胎成纤维细胞表现出了明显的染色体不稳定性。因此,这些数据表明SIRT1在肿瘤形成过程中能够作为肿瘤促进因子。

2.2 SIRT1作为潜在的肿瘤抑制因子 SIRT1可以作为肿瘤促进因子。然而,其他的研究同时表明,SIRT1还能够作为肿瘤抑制因子(图2)。

在过表达SIRT1的转基因鼠中,没有任何肿瘤形成<sup>[39,40]</sup>。敲除或者使用其他方法抑制SIRT1也并不能够活化P53的功能<sup>[41,42]</sup>。Firestein等<sup>[43]</sup>报道,在结肠腺瘤息肉突变转基因小鼠中,过表达SIRT1可以通过其脱乙酰基作用失活β-catenin,进而降低结肠癌的发生率。他们进一步研究发现,过表达SIRT1能够显著抑制结肠癌细胞的增殖。另外,有研究表明,在小鼠转移瘤模型中,敲除SIRT1增加了HCT116结肠癌细胞的增殖<sup>[44]</sup>。

Wang等<sup>[45]</sup>发现,SIRT1的表达在BRCA1相关的乳腺癌中表达高于非BRCA1相关的乳腺癌。他们进一步研究表明,使用SIRT1激活剂resveratrol能够促进这些细胞的凋亡。Howitz等<sup>[46]</sup>的研究也表明,当恢复BRCA1突变癌细胞中SIRT1水平时,肿瘤细胞的增殖被明显抑制。这些表明,SIRT1抑制了BRCA1相关乳腺癌细胞的Survivin, Survivin是多种肿瘤细胞中上调的一种抗凋亡蛋白<sup>[47]</sup>。Pazienza等<sup>[48]</sup>研究了19例结直肠癌标本,发现肿瘤组织中SIRT1水平并非高表达,同时他还研究了结肠癌细胞系CaCo2与SW480细胞,发现两种细胞系中SIRT1水平表现出了明显的差异性。

SIRT1作为肿瘤抑制因子的另一证据来源

于对小鼠p53杂合子的研究. P53+/-在被照射后因丢失p53杂合子而表现出肿瘤加速形成的现象<sup>[49]</sup>. 因为SIRT1能够减低培养细胞中的P53水平, 那么SIRT1+/-P53+/-则应该不易形成肿瘤. 然而结果却并非如同想象, 从5月龄开始SIRT1+/-P53+/-小鼠在诸多器官中均形成了自然发生的肿瘤. 到20月龄, 76%的小鼠发生肿瘤. 其中21只SIRT1+/-小鼠中2只及22只P53+/-小鼠中3只形成肿瘤. 有趣的是, 使用resveratrol药物可以显著减低肿瘤的形成<sup>[50]</sup>.

NF- $\kappa$ B以显与上调控制细胞存活的基因产物相关. Yeung等<sup>[51]</sup>的研究表明, SIRT1能够通过对NF- $\kappa$ B过对的亚单位RelA/p65脱乙酰化, 进而促进TNF-, 导致的凋亡. c-Myc在细胞增殖、凋亡、干细胞更新换代中起着重要作用. SIRT1能够通过脱乙酰化降低c-Myc的稳定性, 进而抑制c-Myc的活性. 最后, 在LNCaP前列腺癌细胞中, SIRT1通过同时脱乙酰化雄激素受体和组蛋白抑制抑制了双氢睾酮依赖的细胞生长<sup>[52,53]</sup>. 综上所述, 多种证据表明, SIRT1作为潜在的肿瘤抑制因子, 显著抑制了肿瘤的发生.

### 3 SIRT1在消化系肿瘤中的双重作用

从上文可以看出, SIRT1作为癌基因/抑癌基因被人们所广泛研究, 而在消化系肿瘤(包括肝癌、胃癌、结直肠癌、胰腺癌等)中亦被重视, 或者说, SIRT1在消化系肿瘤中的研究相比其在其他肿瘤的研究似乎更为广泛与深入. 与其他肿瘤中的角色类似, SIRT1在消化系肿瘤中的角色也被人们所争论.

首先, SIRT1在肝癌中所扮演的角色具有两面性. Chen等<sup>[30]</sup>的研究发现, SIRT1表达水平与肝癌化疗耐药呈正相关, 还得出结论, SIRT1在肝癌中表达情况与肝癌的预后呈正相关. 此外Liang等<sup>[30]</sup>报道使用siRNA降低SIRT1水平, 能够将一种肝癌顺铂耐药细胞的药物敏感程度提高20倍. 通过cDNA转染能够在普通肝癌顺铂敏感细胞中增加顺铂耐药程度达2-3倍. 这些研究都表明, SIRT1在肝癌的发生、侵袭、耐药等过程中起到了重要的作用. 另一方面, 在代谢相关的肝癌中, SIRT1又被认为扮演着抑癌基因的角色. Herranz等<sup>[54]</sup>发现, 通过过表达SIRT1或是去除SIRT1抑制剂DBC1达到上调SIRT1水平, 能够明显改善代谢相关肝癌小鼠模型的肝癌发生率, 而且上调SIRT1水平后, 正常肝脏遭受的高脂损伤明显降低.

在结肠癌的发生过程中, SIRT1更多充当抑癌基因的角色. Stünkel等<sup>[26]</sup>研究了不同的结肠癌细胞系及结肠癌组织标本, 发现在结肠癌细胞系及结肠癌组织标本中SIRT1水平均明显高表达. Akao等<sup>[55]</sup>通过沉默SIRT1改善了结肠癌耐药细胞系DLD-1对5-Fu的药物敏感性, 进而证实了SIRT1在结肠癌耐药中起到作用. 但是随后的研究发现, SIRT1在结肠癌的发生、发展中更多的扮演着抑癌基因的角色. Firestein与Kabra等<sup>[43,44]</sup>的研究发现, 在25%的I/II/III期结肠癌组织中SIRT1水平高表达, 但是在IV肿瘤中并未发现SIRT1水平的上调, 同时, 在所有结肠癌组织中, 尚有30%检测到SIRT1水平低于正常. 此外, 他们还发现, 通过siRNA敲除SIRT1增加了小鼠模型中的结肠癌发生率, 而用白藜芦醇上调SIRT1明显减低了其发生率.

胰腺肿瘤中, SIRT1的作用同样存在争议. Zhao等<sup>[56]</sup>研究了胰腺癌组织及细胞系, 发现HIC1/SIRT1途径在胰腺癌组织及细胞系中均明显上调, 得出结论, SIRT1很可能在胰腺癌的发生、发展过程中起到重要作用. 同时, Cho等<sup>[57]</sup>的研究发现, 在过表达胰腺癌上调因子的胰腺癌细胞系中, SIRT1能够通过抑制 $\beta$ -catenin进而起到抑制细胞增殖的作用.

在胃癌中, SIRT1的研究更加倾向于与胃癌的发生、发展正相关. Cha等<sup>[58]</sup>通过研究胃癌组织标本发现胃癌中DBC1与SIRT1的水平与胃癌的预后明显相关, 胃癌组织中DBC1与SIRT1明显高表达, 而且DBC1与SIRT1的水平和肿瘤分期、淋巴结转移、肿瘤侵袭、P53水平均明显相关.

综上, SIRT1在消化系肿瘤中的角色同其他肿瘤类似, 大都存在争议, 而争论最多的肝癌、结肠癌中, SIRT1到底是作为促进肿瘤发生的癌基因还是抑制肿瘤形成的抑癌基因仍存在明显争议. 而在胃癌中, SIRT1因其在肿瘤组织中高表达及与肿瘤分期等的正相关性而被认为是癌基因, 但在胃癌中的进一步研究结论是否与其他肿瘤类似需要进一步证实.

### 4 结论

通过甲基化组蛋白, 脱乙酰化组蛋白与非组蛋白、甲基化DNA等作用, SIRT1调控着众多细胞内因子, 这些细胞内因子在细胞增殖、衰老、凋亡及血管发生中起到了重要的作用. 肿瘤抑制因子与促进因子平衡关系的打破最终导致了

#### ■应用要点

本文着重从消化系肿瘤方面探讨SIRT1在诸如胃癌、肝癌、胰腺癌、结肠癌等中的关键性作用、存在的争议以及需要进一步解决的问题.



### 同行评价

本文选题具有新颖性, 对肿瘤分子学的研究有一定参考意义。

肿瘤的发生. SIRT1促进肿瘤发生的机制包括: (1)SIRT1通过改变E2F1、FOXO1、FOXO3、FOXO4、P27、P53、P73、SMAD7、Rb、Bcl-6、Ku-70、E-cadherin、GATA4与GATA5的功能抑制了细胞的凋亡; (2)SIRT1通过修饰E2F1、P53、FOXO1/3/4、Rb和P16抑制细胞衰老与分化; (3)SIRT1通过促进肿瘤血管发生促进肿瘤生长. SIRT1去乙酰化FOXO1, 抑制了细胞衰老, 进而促进内皮细胞增殖与血管发生, 而肿瘤血管的发生与肿瘤的营养供应又密切相关. 此外, SIRT1能够通过增加eNOS的功能导致氮氧化物水平的增高, 而氮氧化物水平增高则导致了肿瘤血管数目增加及营养增加. 相反地, SIRT1有可能通过抑制肿瘤促进因子如: catenin、survivin、c-Myc、NF- $\kappa$ B和AR来抑制肿瘤形成. 诸多的SIRT1上游调控因子则对SIRT1水平起到调控作用. 例如: E2F1、AROS、HuR和resveratrol能够上调SIRT1水平或者功能, 而p53、HIC1、DBC1和cyclin B/CDK1能够下调SIRT1水平或其功能. 有趣的是, 很多SIRT1上游调控因子同时是SIRT1下游调控因子, 当然这很可能是SIRT1的负反馈调节.

在消化系肿瘤中, 多方面的研究得到了不同的结果. 在肝癌、结肠癌、胰腺癌中人们存在广泛争论, SIRT1能够在同一肿瘤中同时作为癌基因与抑癌基因, 肝癌、结肠癌、胰腺癌细胞系/组织中均检测到SIRT1水平高表达, 而通过不同途径上调SIRT1水平降低了小鼠模型的肿瘤发生率, 这一矛盾的现象为人们多不解. 在胃癌中, 大都倾向于SIRT1促进了肿瘤的发生、发展、耐药, 原因类似于其他肿瘤中的SIRT1水平高表达, 所以, 胃癌中的SIRT1深入研究是否同其他肿瘤类似将会非常有趣.

SIRT1在肿瘤发生中的作用仍具有争议性, 而SIRT1在肿瘤发生过程中到底起到抑制作用还是促进作用可能依赖于时间点不同及上下游调控因子的不同. 显而易见的是, SIRT1是调控细胞增殖、凋亡、衰老和血管发生等过程的众多细胞因子中最具典型的一种. 事实上, 在肿瘤抑制因子与促进因子之间的平衡关系才是在肿瘤发生中起到决定性作用的. 因此, 对于SIRT1在特定肿瘤环境中的特别作用的进一步研究是非常有必要的. 然而, 虽然目前技术不断进步, 但是SIRT1的活性如何检测仍没有确切的办法. SIRT1蛋白水平、NAD<sup>+</sup>浓度和SIRT1甲基化片段都被用来替代检测SIRT1功能. 然而用这些指

标来替代却并不能确切衡量, 因为许多蛋白都可能调节SIRT1的功能. 所有研究的终极目的都在研究药物能够于上调或者下调SIRT1功能. 虽然已经有大量关于SIRT1的研究, 但是进一步的深入研究无疑可以增加我们对于SIRT1在不同肿瘤中扮演的不同角色的认识. 在未来不久, 我们期望对SIRT1的靶向治疗能够转变成成为肿瘤治疗的新方法.

### 参考文献

- 1 Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 502-511 [PMID: 18234754 DOI: 10.1056/NEJMra072367]
- 2 Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 157-162 [PMID: 11905807 DOI: 10.1038/35101031]
- 3 Herranz D, Serrano M. SIRT1: recent lessons from mouse models. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 819-823 [PMID: 21102633 DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.026]
- 4 Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G, Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys* 2010; 501: 79-90 [PMID: 20450879 DOI: 10.1016/j.abb.2010.05.003]
- 5 Yi J, Luo J. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 1684-1689 [PMID: 20471503 DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.05.002]
- 6 Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 2010; 5: 253-295 [PMID: 20078221 DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250]
- 7 de Boer VC, de Goffau MC, Arts IC, Hollman PC, Keijer J. SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 618-627 [PMID: 16603228 DOI: 10.1016/j.mad.2006.02.007]
- 8 Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 444: 337-342 [PMID: 17086191 DOI: 10.1038/nature05354]
- 9 Argmann C, Auwerx J. Insulin secretion: SIRT4 gets in on the act. *Cell* 2006; 126: 837-839 [PMID: 16959562 DOI: 10.1016/j.cell.2006.08.031]
- 10 Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 2009; 137: 560-570 [PMID: 19410549]
- 11 Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padiella-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TL, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* 2008; 452: 492-496 [PMID: 18337721 DOI: 10.1038/nature06736]
- 12 Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with

- histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell* 2004; 16: 93-105 [PMID: 15469825 DOI: 10.1016/j.molcel.2004.08.031]
- 13 Liu T, Liu PY, Marshall GM. The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 1702-1705 [PMID: 19244112 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3365]
  - 14 Vaquero A, Scher M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Serrano L, Reinberg D. SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* 2007; 450: 440-444 [PMID: 18004385 DOI: 10.1038/nature06268]
  - 15 Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A, Preissner TS, Scher M, Kirmizis A, Ouyang X, Brockdorff N, Abate-Shen C, Farnham P, Reinberg D. Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 1859-1864 [PMID: 15684044 DOI: 10.1073/pnas.0409875102]
  - 16 Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 1666-1675 [PMID: 19879981 DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.10.022]
  - 17 Wang C, Chen L, Hou X, Li Z, Kabra N, Ma Y, Nemoto S, Finkel T, Gu W, Cress WD, Chen J. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1025-1031 [PMID: 16892051 DOI: 10.1038/ncb1468]
  - 18 Heltweg B, Gatbonton T, Schuler AD, Posakony J, Li H, Goehle S, Kollipara R, Depinho RA, Gu Y, Simon JA, Bedalov A. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res* 2006; 66: 4368-4377 [PMID: 16618762 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3617]
  - 19 Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001; 107: 137-148 [PMID: 11672522 DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00524-4]
  - 20 Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE, McGarvey KM, Kang SH, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* 2006; 2: e40 [PMID: 16596166 DOI: 10.1371/journal.pgen.0020040]
  - 21 Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W, Baylin SB. Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 2005; 123: 437-448 [PMID: 16269335 DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.011]
  - 22 Ford J, Ahmed S, Allison S, Jiang M, Milner J. JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein stability. *Cell Cycle* 2008; 7: 3091-3097 [PMID: 18838864 DOI: 10.4161/cc.7.19.6799]
  - 23 Jung-Hynes B, Nihal M, Zhong W, Ahmad N. Role of sirtuin histone deacetylase SIRT1 in prostate cancer. A target for prostate cancer management via its inhibition? *J Biol Chem* 2009; 284: 3823-3832 [PMID: 19075016 DOI: 10.4161/cc.8.10.8408]
  - 24 Huffman DM, Grizzle WE, Bamman MM, Kim JS, Eltoun IA, Elgavish A, Nagy TR. SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 6612-6618 [PMID: 17638871 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0085]
  - 25 Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, Craddock C, Turner BM. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* 2005; 19: 1751-1759 [PMID: 16121216 DOI: 10.1038/sj.leu.2403910]
  - 26 Stünkel W, Peh BK, Tan YC, Nayagam VM, Wang X, Salto-Tellez M, Ni B, Entzeroth M, Wood J. Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol J* 2007; 2: 1360-1368 [PMID: 17806102]
  - 27 Lim CS. SIRT1: tumor promoter or tumor suppressor? *Med Hypotheses* 2006; 67: 341-344 [PMID: 16546327 DOI: 10.1016/j.mehy.2006.01.050]
  - 28 Ford J, Jiang M, Milner J. Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res* 2005; 65: 10457-10463 [PMID: 16288037 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1923]
  - 29 Liang XJ, Finkel T, Shen DW, Yin JJ, Aszalos A, Gottesman MM. SIRT1 contributes in part to cisplatin resistance in cancer cells by altering mitochondrial metabolism. *Mol Cancer Res* 2008; 6: 1499-1506 [PMID: 18723829 DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2130]
  - 30 Chen HC, Jeng YM, Yuan RH, Hsu HC, Chen YL. SIRT1 promotes tumorigenesis and resistance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma and its expression predicts poor prognosis. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 2011-2019 [PMID: 22146883]
  - 31 Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; 303: 2011-2015 [PMID: 14976264 DOI: 10.1126/science.1094637]
  - 32 Lee H, Kim KR, Noh SJ, Park HS, Kwon KS, Park BH, Jung SH, Youn HJ, Lee BK, Chung MJ, Koh DH, Moon WS, Jang KY. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis for breast carcinoma. *Hum Pathol* 2011; 42: 204-213 [PMID: 21056897]
  - 33 Elangovan S, Ramachandran S, Venkatesan N, Ananth S, Gnana-Prakasam JP, Martin PM, Browning DD, Schoenlein PV, Prasad PD, Ganapathy V, Thangaraju M. SIRT1 is essential for oncogenic signaling by estrogen/estrogen receptor  $\alpha$  in breast cancer. *Cancer Res* 2011; 71: 6654-6664 [PMID: 21920899]
  - 34 Feng AN, Zhang LH, Fan XS, Huang Q, Ye Q, Wu HY, Yang J. Expression of SIRT1 in gastric cardiac cancer and its clinicopathologic significance. *Int J Surg Pathol* 2011; 19: 743-750 [PMID: 21865267]
  - 35 Wang H, Liu H, Chen K, Xiao J, He K, Zhang J, Xiang G. SIRT1 promotes tumorigenesis of hepatocellular carcinoma through PI3K/PTEN/AKT signaling. *Oncol Rep* 2012; 28: 311-318 [PMID: 22552445]
  - 36 Nakane K, Fujita Y, Terazawa R, Atsumi Y, Kato T, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. Inhibition of cortactin and SIRT1 expression attenuates migration and invasion of prostate cancer DU145 cells. *Int J Urol* 2012; 19: 71-79 [PMID: 22050448]
  - 37 Cardiff RD, Anver MR, Gusterson BA, Hennighausen L, Jensen RA, Merino MJ, Rehm S, Russo J, Tavassoli FA, Wakefield LM, Ward JM, Green JE. The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene* 2000; 19: 968-988 [PMID: 10713680 DOI: 10.1038/sj.onc.1203277]

- 38 McBurney MW, Yang X, Jardine K, Bieman M, Th'ng J, Lemieux M. The absence of SIR2alpha protein has no effect on global gene silencing in mouse embryonic stem cells. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 402-409 [PMID: 12651913]
- 39 Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, Manis JP, Gu Y, Patel P, Bronson R, Appella E, Alt FW, Chua KF. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10794-10799 [PMID: 12960381]
- 40 Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutiérrez-Juárez R, Rossetti L, Gu W, Accili D. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 2008; 8: 333-341 [PMID: 18840364 DOI: 10.1016/j.cmet.2008.08.014]
- 41 Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 9793-9798 [PMID: 18599449 DOI: 10.1073/pnas.0802917105]
- 42 Solomon JM, Pasupuleti R, Xu L, McDonagh T, Curtis R, DiStefano PS, Huber LJ. Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 28-38 [PMID: 16354677]
- 43 Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, Bhimavarapu A, Luikenhuis S, de Cabo R, Fuchs C, Hahn WC, Guarente LP, Sinclair DA. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One* 2008; 3: e2020 [PMID: 18414679 DOI: 10.1371/journal.pone.0002020]
- 44 Kabra N, Li Z, Chen L, Li B, Zhang X, Wang C, Yeatman T, Coppola D, Chen J. SirT1 is an inhibitor of proliferation and tumor formation in colon cancer. *J Biol Chem* 2009; 284: 18210-18217 [PMID: 19433578 DOI: 10.1074/jbc.M109.000034]
- 45 Wang RH, Zheng Y, Kim HS, Xu X, Cao L, Luhasen T, Lee MH, Xiao C, Vassilopoulos A, Chen W, Gardner K, Man YG, Hung MC, Finkel T, Deng CX. Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Mol Cell* 2008; 32: 11-20 [PMID: 18851829 DOI: 10.1016/j.molcel.2008.09.011]
- 46 Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003; 425: 191-196 [PMID: 12939617 DOI: 10.1038/nature01960]
- 47 Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 61-70 [PMID: 18075512 DOI: 10.1038/nrc2293]
- 48 Paziienza V, Piepoli A, Panza A, Valvano MR, Benegiamo G, Vinciguerra M, Andriulli A, Mazzoccoli G. SIRT1 and the clock gene machinery in colorectal cancer. *Cancer Invest* 2012; 30: 98-105 [PMID: 22149272]
- 49 Yuan J, Pu M, Zhang Z, Lou Z. Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. *Cell Cycle* 2009; 8: 1747-1753 [PMID: 19411844 DOI: 10.4161/cc.8.11.8620]
- 50 Yuan J, Minter-Dykhous K, Lou Z. A c-Myc-SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation. *J Cell Biol* 2009; 185: 203-211 [PMID: 19364925 DOI: 10.1083/jcb.200809167]
- 51 Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 2004; 23: 2369-2380 [PMID: 15152190 DOI: 10.1038/sj.emboj.7600244]
- 52 Dai Y, Ngo D, Forman LW, Qin DC, Jacob J, Faller DV. Sirtuin 1 is required for antagonist-induced transcriptional repression of androgen-responsive genes by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 1807-1821 [PMID: 17505061 DOI: 10.1210/me.2006-0467]
- 53 Fu M, Liu M, Sauve AA, Jiao X, Zhang X, Wu X, Powell MJ, Yang T, Gu W, Avantiaggiati ML, Patabiraman N, Pestell TG, Wang F, Quong AA, Wang C, Pestell RG. Hormonal control of androgen receptor function through SIRT1. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 8122-8135 [PMID: 16923962 DOI: 10.1128/MCB.00289-06]
- 54 Herranz D, Muñoz-Martín M, Cañamero M, Mulero F, Martínez-Pastor B, Fernández-Capetillo O, Serrano M. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun* 2010; 1: 3 [PMID: 20975665]
- 55 Akao Y, Noguchi S, Iio A, Kojima K, Takagi T, Naoe T. Dysregulation of microRNA-34a expression causes drug-resistance to 5-FU in human colon cancer DLD-1 cells. *Cancer Lett* 2011; 300: 197-204 [PMID: 21067862]
- 56 Zhao G, Qin Q, Zhang J, Liu Y, Deng S, Liu L, Wang B, Tian K, Wang C. Hypermethylation of HIC1 Promoter and Aberrant Expression of HIC1/SIRT1 Might Contribute to the Carcinogenesis of Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol* 2012 May 3. [Epub ahead of print] [PMID: 22552606]
- 57 Cho IR, Koh SS, Malilas W, Srisuttee R, Moon J, Choi YW, Horio Y, Oh S, Chung YH. SIRT1 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells expressing pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF), a novel oncogene, by suppression of beta-catenin. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 423: 270-275 [PMID: 22640743]
- 58 Cha EJ, Noh SJ, Kwon KS, Kim CY, Park BH, Park HS, Lee H, Chung MJ, Kang MJ, Lee DG, Moon WS, Jang KY. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis of gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4453-4459 [PMID: 19509139 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3329]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



# 阿司匹林对HT-29、SW480结肠癌细胞株CD133表达的影响

陈小燕, 廖永美, 刘胜远, 赵 逵

陈小燕, 廖永美, 赵逵, 遵义医学院附属医院消化内科 贵州省遵义市 563099

刘胜远, 遵义医学院附属医院神经外科 贵州省遵义市 563099

陈小燕, 在读硕士, 主要从事大肠癌的研究工作。

贵州省高层次人才科研条件特助经费基金资助项目, No. TZJF-2011-32

作者贡献分布: 此课题由赵逵与廖永美设计; 研究过程由廖永美操作完成; 本论文初稿写作、修改及定稿由陈小燕与刘胜远共同完成; 文献查阅及校对由陈小燕完成; 赵逵审阅。

通讯作者: 赵逵, 教授, 主任医师, 563099, 贵州省遵义市大连路201号, 遵义医学院附属医院消化内科. kuizhao95868@msn.com

收稿日期: 2012-11-14 修回日期: 2012-12-20

接受日期: 2012-12-28 在线出版日期: 2013-01-08

## Treatment with aspirin inhibits the expression of CD133 in human colorectal cancer cells HT-29 and SW480

Xiao-Yan Chen, Yong-Mei Liao, Sheng-Yuan Liu, Kui Zhao

Xiao-Yan Chen, Yong-Mei Liao, Kui Zhao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 536099, Guizhou Province, China  
Sheng-Yuan Liu, Department of Neurosurgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 536099, Guizhou Province, China

Supported by: the Special Scientific Research Fund for High-level Talents of Guizhou Province, No. TZJF-2011-32

Correspondence to: Kui Zhao, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, 201 Dalian Road, Zunyi 536099, Guizhou Province, China. kuizhao95868@msn.com

Received: 2012-11-14 Revised: 2012-12-20

Accepted: 2012-12-28 Published online: 2013-01-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of treatment with aspirin on CD133 protein expression in colorectal cancer cell (CRC) lines.

**METHODS:** HT-29 and SW480 cells were treated with different concentrations of aspirin (0.0, 2.5, 5.0, or 10.0 mmol/L), and the expression of CD133 was detected by flow cytometry.

**RESULTS:** Flow cytometry results demonstrated that the proportions of CD133<sup>+</sup> cells were 88.37% ± 1.00% and 65.22% ± 1.52% in HT-29

and SW480 cells, respectively. Treatment with aspirin significantly reduced the expression of CD133 in HT-29 and SW480 cells in a concentration-dependent manner (both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Treatment with aspirin can inhibit the expression of CD133 in HT-29 and SW480 cells in a concentration-dependent manner.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Aspirin; Colorectal cancer; Colorectal cancer cells; CD133; Flow Cytometry; HT-29; SW480

Chen XY, Liao YM, Liu SY, Zhao K. Treatment with aspirin inhibits the expression of CD133 in human colorectal cancer cells HT-29 and SW480. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 13-18

### 摘要

**目的:** 观察阿司匹林对人结肠癌肿瘤干细胞标志物CD133表达的影响, 探讨其对结肠癌干细胞的作用。

**方法:** 流式细胞仪检测结肠癌细胞株HT-29和SW480在不同浓度阿司匹林(0、2.5、5.0、10.0 mmol/L)作用下CD133的表达变化。

**结果:** 流式细胞仪检测结果显示CD133<sup>+</sup>细胞在HT-29细胞株中的比例为88.37% ± 1.00%, 在SW480细胞系中的比例为65.22% ± 1.50%。用阿司匹林干预后, 随着阿司匹林浓度的增加, CD133在结肠癌细胞系HT-29和SW480中的表达呈下降趋势, 差异有统计学意义(45.41 ± 1.09, 55.31 ± 1.07 vs 73.45 ± 1.04; 28.28 ± 0.30, 42.27 ± 0.78 vs 58.96 ± 0.09, 均 $P < 0.05$ )。

**结论:** 阿司匹林能抑制结肠癌细胞株HT-29和SW480中CD133的表达, 呈剂量依赖性。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 阿司匹林; 结肠癌; 肿瘤干细胞; CD133; 流式细胞仪; HT-29; SW480

### ■背景资料

肿瘤干细胞(CSCs)是肿瘤发生的根源, 也是彻底根治肿瘤的靶点。CD133是CSCs标志物之一, 在多种实体肿瘤中表达, 包括结直肠癌、脑胶质瘤等。CD133<sup>+</sup>细胞比例与肿瘤的侵袭性、病理分级及临床预后密切相关, 可能成为潜在的治疗靶点。

### ■同行评议者

杜祥, 教授, 主任医师, 上海复旦大学附属肿瘤医院

## ■ 研发前沿

非甾体抗炎药(NSAIDs)阿司匹林除具有解热镇痛抗炎作用外,还可以降低腺瘤和结直肠癌发生的风险,有效预防结直肠癌发生,甚至可以降低患者的死亡率以及改善生存质量。然而阿司匹林对肿瘤干细胞标志物CD133有何影响以及如何作用于结直肠癌干细胞,都尚不清楚,需进一步研究。

陈小燕, 廖永美, 刘胜远, 赵逵. 阿司匹林对HT-29、SW480结直肠癌细胞株CD133表达的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(1): 13-18

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/13.asp>

## 0 引言

近年来, 肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)概念<sup>[1,2]</sup>的提出更好地解释了放、化疗与生物免疫治疗等方法能够杀灭大部分肿瘤细胞而无法从根本上治愈结直肠癌的问题, 并为研究肿瘤细胞的生物学特性提供了新的方向和思路以及为肿瘤的临床治疗提供了新的靶点, 目前已逐渐成为肿瘤防治研究的新热点. CD133是CSCs标志物之一<sup>[3]</sup>, 在多种实体肿瘤中表达, 包括结直肠癌、脑胶质瘤等<sup>[4,5]</sup>. CD133<sup>+</sup>细胞比例与肿瘤的侵袭性、病理分级及临床预后密切相关<sup>[6]</sup>, 可能成为潜在的治疗靶点. 阿司匹林作为一种临床常用的非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 除具有解热镇痛抗炎作用外, 还可以降低腺瘤和结直肠癌发生的风险<sup>[7,8]</sup>, 有效预防结直肠癌发生<sup>[9]</sup>, 甚至可以降低患者的死亡率以及改善生存质量<sup>[7]</sup>, 尤其是在最初的5年<sup>[8]</sup>. 然而阿司匹林是如何作用于结直肠癌干细胞, 对CSCs标志物CD133又有何影响, 都尚不清楚. 本研究拟通过对不同浓度的阿司匹林对人结肠癌细胞株HT-29、SW480中CSCs标志物CD133表达的影响进行研究, 以探讨其对结直肠癌干细胞是否有潜在的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人结肠癌细胞株HT-29、SW480分别购自中科院上海细胞库、重庆医科大学细胞实验室; 阿司匹林、McCoy'S 5a培养基及胰蛋白酶购自美国Sigma公司; 胎牛血清购自美国Hyclone公司; 小鼠抗人CD133单克隆抗体、同型抗体mouse IgG2a-PE购自德国Miltenyi-Biotec公司; 流式细胞仪为美国BD公司产品.

### 1.2 方法

1.2.1 细胞的培养: 人结肠癌细胞株HT-29、SW480培养于含10%胎牛血清的McCoy'S 5a培养基, 置于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>的培养箱中常规培养, 待细胞贴壁生长至80%-90%融合时, 用0.25%胰蛋白酶与0.02% EDTA混合液进行消化传代. 细胞生长状态良好、处于对数期时用于实验.

1.2.2 流式细胞仪直接免疫荧光法检测在不同浓度阿司匹林作用下CD133的表达: 取对数生长期

表1 HT-29细胞和SW480细胞中不同组别中表达CD133<sup>+</sup>百分率的比较 (*n* = 3)

分组	CD133阳性率(%)	
	HT-29	SW480
对照组	88.37 ± 1.00	65.22 ± 1.52
2.5 mmol/L	73.45 ± 1.04 <sup>a</sup>	58.96 ± 0.09 <sup>a</sup>
5.0 mmol/L	55.31 ± 1.07 <sup>ac</sup>	42.27 ± 0.78 <sup>ac</sup>
10.0 mmol/L	45.41 ± 1.09 <sup>ac</sup>	28.28 ± 0.30 <sup>ac</sup>

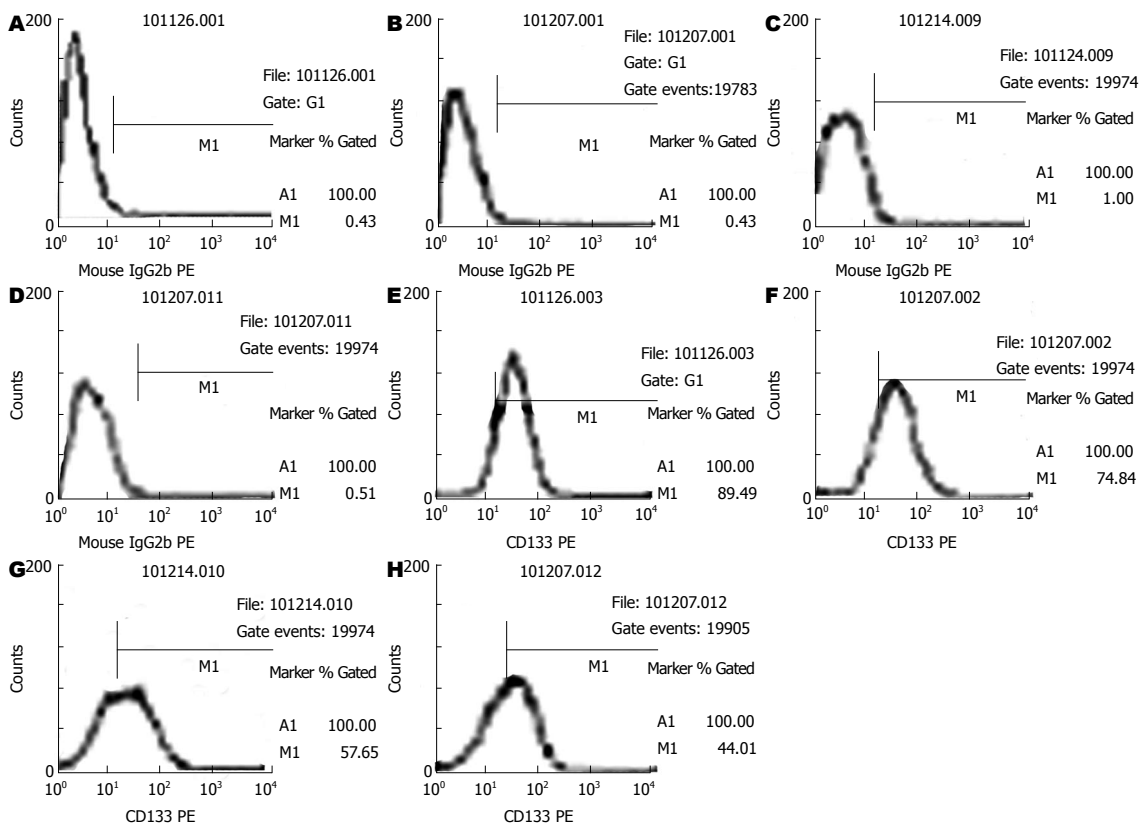
<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 对照组; <sup>b</sup>*P* < 0.01 vs 2.5 mmol/L组.

的结肠癌细胞株HT-29、SW480, 用0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA混合液进行消化, 离心计数, 用McCoy'S 5a完全培养液稀释至5 × 10<sup>4</sup>个/mL的单细胞悬液, 接种于50 mL细胞培养瓶中培养, 待细胞培养24 h后, 换用无血清培养基进行同步化培养. 同步化培养24 h后按分组加药: 0、2.5、5.0、10.0 mmol/L, HT-29细胞再继续培养48 h、SW480细胞再继续培养72 h后, 用0.25%胰蛋白酶与0.02% EDTA混合液进行消化制成单细胞悬液, 离心计数, PBS洗涤1次, 离心300 g, 10 min, 去上清, 调整浓度为1 × 10<sup>7</sup>个/mL, 每管加入100 μL单细胞悬液, 加入PE标记的小鼠抗人CD133单克隆抗体10 μL, 同时在对照细胞中添加相应的同型对照Mouse IgG2a-PE 10 μL, 避光, 4℃. 放置30 min, PBS洗2次, 除去未结合一抗, 离心300 g, 10 min, 去除上清液体, 各管加入500 μL PBS重悬; 标记好的细胞悬液经200目筛网滤过, 上流式细胞仪分析.

**统计学处理** 计量资料均采用mean ± SD表示, 采用SPSS17.0统计学软件进行统计学处理, 组内的比较采用单因素方差分析, 组间比较采用独立样本*t*检验, *P* < 0.05表示差异有统计学意义.

## 2 结果

流式细胞仪检测结肠癌细胞株HT-29和SW480细胞中CD133<sup>+</sup>细胞在不同药物组的百分率比较结果显示(表1, 图1-3), CD133在结肠癌细胞株HT-29和SW480中大量表达, CD133<sup>+</sup>细胞在上述两种细胞系中的比例分别为88.37% ± 1.00%, 65.22% ± 1.52%. 用阿司匹林干预后, 随着药物浓度的增加, CD133<sup>+</sup>细胞在结肠癌细胞株HT-29和SW480细胞中的比例呈明显的下降趋势, 并具有良好的量-效关系, 与对照组相比, 差异有统计学意义(45.41 ± 1.09, 55.31 ± 1.07 vs 73.45 ±



**■ 相关报道**  
英国纽卡斯尔大学的研究发现长期服用小剂量阿司匹林可使易引发结直肠癌的林奇综合征患者肠癌的发病率降低, 他们认为阿司匹林对结肠内的异常干细胞存活有一定影响。

图 1 不同浓度阿司匹林作用后HT-29细胞中CD133<sup>+</sup>细胞比例流式图. A-D: 同型对照组; E-H: 药物组. A, E: 对照组; B-F: 2.5 mmol/L; C, G: 5.0 mmol/L; D, H: 10.0 mmol/L.

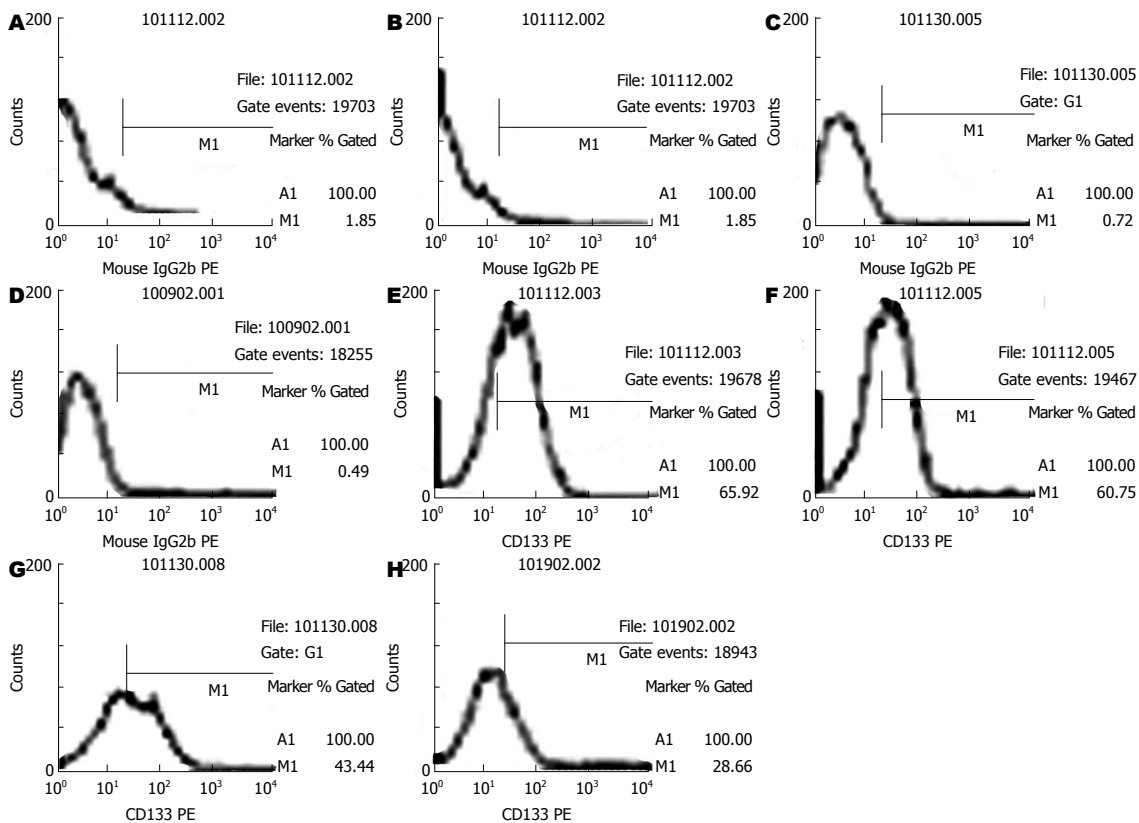


图 2 不同浓度阿司匹林作用后SW480细胞中CD133<sup>+</sup>细胞比例流式图. A-D: 同型对照组; E-H: 药物组. A, E: 对照组; B-F: 2.5 mmol/L; C, G: 5.0 mmol/L; D, H: 10.0 mmol/L.

### ■ 创新盘点

本课题以流式细胞仪直接免疫荧光法检测在不同浓度阿司匹林作用下CD133的表达变化,探讨其对结肠癌干细胞的作用。

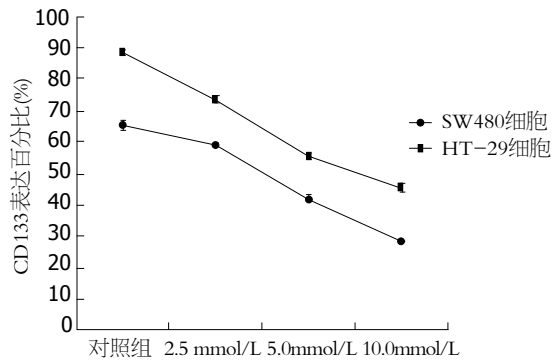


图 3 HT-29细胞和SW480细胞中不同浓度阿司匹林对CD133表达的影响比较。

1.04;  $28.28 \pm 0.30$ ,  $42.27 \pm 0.78$  vs  $58.96 \pm 0.09$ , 均  $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

结直肠癌是胃肠道中最常见的恶性肿瘤之一,居全球肿瘤发病率的第3位<sup>[10]</sup>,并且其治疗面临着多耐药性、高复发率等诸多挑战.近年来,CSCs理论认为CSCs是肿瘤发生的根源,也是彻底根治肿瘤的靶点<sup>[11]</sup>,因此为肿瘤研究和治疗提供了新的方向.CSCs是指存在于肿瘤组织内的一群数目极少但具有自我更新和增殖能力的细胞,能够分化为不同表型的癌细胞,在肿瘤的发生、发展和转归过程中发挥重要作用<sup>[1,12]</sup>.迄今为止,已经发现了大量与CSCs相关的表面标志物,如CD133、Lgr5<sup>[13,14]</sup>、CD44<sup>[15]</sup>、CD166<sup>[16]</sup>、Bmi-1<sup>[17]</sup>及DCAMKL-1<sup>[18]</sup>等,在这些标志物中最引人关注的是CD133,也是研究较多的CSCs标志物。

近年来研究发现,CD133可以作为结直肠癌干细胞鉴定的标志物.尽管CD133已经用于分离包括结肠癌在内的各种CSCs,但其功能目前还不是很清楚<sup>[19]</sup>.有研究发现CD133的表达与结直肠癌患者的预后密切相关,Zhang等<sup>[4]</sup>对II-III期结肠癌患者CD133和CXCR4共表达的研究表明,CD133和CXCR4共表达是患者不良预后的危险因素,同时指出CD133推动了癌症发展.Coco等<sup>[20]</sup>的研究也指出,CD133表达增高在结直肠癌中频繁发生,其高表达预示着患者预后较差,因此对CD133表达的评估可以帮助识别高危结肠癌患者.Horst等<sup>[21]</sup>还发现CD133与CD44、CD166相比而言,是预测患者预后最好的指标.研究表明,CD133<sup>+</sup>肿瘤细胞促进了肿瘤细胞的复发,可能是由于CD133<sup>+</sup>细胞能够逃避固有免疫和适应性免疫监视,参与肿瘤血管的形成,干细胞相关信号通路的激活,并借助自分泌作用产生IL-4介

导耐药<sup>[22]</sup>及阻止这些细胞凋亡<sup>[23]</sup>,其大量表达会导致化疗药物失效,造成肿瘤的复发和转移<sup>[24]</sup>.因此CD133可能成为结直肠癌治疗的一潜在靶点。

本研究结果显示,CD133<sup>+</sup>细胞在HT-29细胞株中的比例为 $88.37\% \pm 1.00\%$ ,在SW480细胞株中的比例为 $65.22\% \pm 1.50\%$ .Elsaba等<sup>[25]</sup>同样运用流式细胞仪检测8种结肠癌细胞株中CD133<sup>+</sup>细胞比例的结果显示,其比例在0%-95%不等,其中HT-29细胞中CD133<sup>+</sup>细胞比例最高,大于95%,而SW480细胞中CD133<sup>+</sup>细胞比例占40%左右的,这与本研究结果大致相符.Kawamoto等<sup>[26]</sup>的研究显示,结肠癌细胞株SW620含有CD133<sup>+</sup>和CD133<sup>-</sup>两种细胞表型,而前者与CSCs的特性相一致.由此表明,CD133可作为识别和鉴定结直肠癌干细胞的标志物.此外研究表明,CD133<sup>+</sup>细胞比例与肿瘤的侵袭性、病理分级及临床预后密切相关.Lee等<sup>[27]</sup>研究发现,HT-29细胞中,CD133<sup>+</sup>细胞较CD133<sup>-</sup>细胞有更强的致瘤性,并且上述两种细胞的蛋白表达是有差异的,例如与肿瘤转移和浸润有关的肌动蛋白相关蛋白2/3复合体亚单位和肌动蛋白结合蛋白在CD133<sup>+</sup>细胞中表达上调,其对肿瘤的发生和干细胞特性起重要作用。

大量的证据表明,服用阿司匹林或其他NSAIDs可以减少患结直肠癌的危险、改善结直肠癌患者的预后以及降低术后复发率等.Fox等<sup>[28]</sup>研究发现每日服用阿司匹林可使其癌症死亡风险降低16%.然而其对CSCs的作用机制尚不清楚,对CSCs标志物CD133有何影响,都有待进一步研究.本研究初步显示,不同药物浓度的阿司匹林能够有效抑制对体外培养的结肠癌细胞株HT-29和SW480细胞中CD133的表达,并呈良好的剂量依赖关系,对照组和药物组之间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ).这和英国纽卡斯尔大学的研究相符,其研究发现长期服用小剂量阿司匹林可使易引发结直肠癌的林奇综合征患者肠癌的发病率降低,他们认为阿司匹林对结肠内的异常干细胞存活有影响.同时Lou等<sup>[29]</sup>关于阿司匹林对内皮祖细胞生物学的研究也表明,阿司匹林可以降低受试者外周血中CD133<sup>+</sup>内皮祖细胞的比例,呈明显的时效关系,但与量效关系不大.Mak等<sup>[30]</sup>的研究指出,下调CD133导致 $\beta$ -catenin的乙酰化和降解的增加,从而抑制肿瘤的生长增殖.安敏等<sup>[31]</sup>研究也显示阿司匹林对结肠癌细胞株Caco-2的生长起抑制作用,呈剂

量-时间依赖性. Zhu等<sup>[32]</sup>发现内源性Wnt信号激活能破坏隐窝的结构并导致CD133<sup>+</sup>干细胞比例增加, 最终导致在小肠黏膜的恶性转化. 这一些结果均提示CD133<sup>+</sup>结肠癌干细胞与Wnt信号通路之间的潜在联系. 因此, 我们推测阿司匹林对结肠癌CSCs的作用可能涉及到Wnt/ $\beta$ -catenin通路.

总之, 本研究结果表明CD133在人结肠癌HT-29和SW480细胞株中大量表达, 表明其可作为识别和鉴定结直肠癌干细胞的标志物和进行干预治疗的观察指标. 同时阿司匹林可减少CSCs标志物CD133的表达而抑制CSCs, 其机制可能涉及到Wnt/ $\beta$ -catenin通路, 为NSAIDs阿司匹林临床防治结直肠癌提供了新的相关实验依据. 然而阿司匹林抑制CD133的表达所涉及的具体机制仍需进一步研究.

#### 4 参考文献

- Kemper K, Prasetyanti PR, De Lau W, Rodermond H, Clevers H, Medema JP. Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* 2012; 30: 2378-2386 [PMID: 22969042 DOI: 10.1002/stem.1233]
- Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 2007; 58: 267-284 [PMID: 17002552]
- Kawamoto A, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Morimoto Y, Fujikawa H, Iwata T, Matsushita K, Yokoe T, Yasuda H, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Clinical significance of radiation-induced CD133 expression in residual rectal cancer cells after chemoradiotherapy. *Exp Ther Med* 2012; 3: 403-409 [PMID: 22969903]
- Zhang NH, Li J, Li Y, Zhang XT, Liao WT, Zhang JY, Li R, Luo RC. Co-expression of CXCR4 and CD133 proteins is associated with poor prognosis in stage II-III colon cancer patients. *Exp Ther Med* 2012; 3: 973-982 [PMID: 22970002]
- Gopisetty G, Xu J, Sampath D, Colman H, Puduvali VK. Epigenetic regulation of CD133/PROM1 expression in glioma stem cells by Sp1/myc and promoter methylation. *Oncogene* 2012 Sep 3. [Epub ahead of print] [PMID: 22945648 DOI: 10.1038/onc.2012.331.]
- Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133<sup>+</sup> cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; 5: 67 [PMID: 17140455]
- McCowan C, Munro AJ, Donnan PT, Steele RJ. Use of aspirin post-diagnosis in a cohort of patients with colorectal cancer and its association with all-cause and colorectal cancer specific mortality. *Eur J Cancer* 2012 Nov 19. [Epub ahead of print] [PMID: 23182687 DOI: 10.1016/j.ejca.2012.10.024.]
- Walker AJ, Grainge MJ, Card TR. Aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drug use and colorectal cancer survival: a cohort study. *Br J Cancer* 2012; 107: 1602-1607 [PMID: 23011483 DOI: 10.1038/bjc.2012.427.]
- Fernández Calderón M, Betés Ibáñez MT. [Aspirin in the primary prevention of colorectal cancer]. *An Sist Sanit Navar* 2012; 35: 261-267 [PMID: 22948427]
- Grizzi F, Celesti G, Basso G, Laghi L. Tumor budding as a potential histopathological biomarker in colorectal cancer: Hype or hope? *World J Gastroenterol* 2012; 18: 6532-6536 [PMID: 23236225 DOI: 10.3748/wjg.v18.i45.6532.]
- Karlic H, Herrmann H, Schulenburg A, Grunt TW, Laffer S, Mirkina I, Hubmann R, Shehata M, Marian B, Selzer E, Pfeilstöcker M, Pittermann E, Jäger U, Pehamberger H, Zielinski C, Valent P. [Tumor stem cell research - basis and challenge for diagnosis and therapy]. *Wien Klin Wochenschr* 2010; 122: 423-436
- Mélin C, Perraud A, Akil H, Jauberteau MO, Cardot P, Mathonnet M, Battu S. Cancer stem cell sorting from colorectal cancer cell lines by sedimentation field flow fractionation. *Anal Chem* 2012; 84: 1549-1556 [PMID: 22236375 DOI: 10.1021/ac]
- Wu XS, Xi HQ, Chen L. Lgr5 is a potential marker of colorectal carcinoma stem cells that correlates with patient survival. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 244 [PMID: 23153436 DOI: 10.1186/1477-7819-10-244.]
- Kleist B, Xu L, Kersten C, Seel V, Li G, Poetsch M. Single nucleotide polymorphisms of the adult intestinal stem cell marker Lgr5 in primary and metastatic colorectal cancer. *Am J Transl Res* 2012; 4: 279-290 [PMID: 22937206]
- de Beça FF, Caetano P, Gerhard R, Alvarenga CA, Gomes M, Paredes J, Schmitt F. Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. *J Clin Pathol* 2012 Oct 30. [Epub ahead of print] [PMID: 23112116]
- Piscuoglio S, Lehmann FS, Zlobec I, Tornillo L, Dietmaier W, Hartmann A, Wünsch PH, Sessa F, Rümmele P, Baumhoer D, Terracciano LM. Effect of EpCAM, CD44, CD133 and CD166 expression on patient survival in tumours of the ampulla of Vater. *J Clin Pathol* 2012; 65: 140-145 [PMID: 22130902 DOI: 10.1136/jclinpath-]
- Wang Y, Zhe H, Ding Z, Gao P, Zhang N, Li G. Cancer stem cell marker Bmi-1 expression is associated with basal-like phenotype and poor survival in breast cancer. *World J Surg* 2012; 36: 1189-1194 [PMID: 22366984 DOI: 0.1007/s00268-012-1514-3.]
- Sureban SM, May R, Ramalingam S, Subramaniam D, Natarajan G, Anant S, Houchen CW. Selective blockade of DCAMKL-1 results in tumor growth arrest by a Let-7a MicroRNA-dependent mechanism. *Gastroenterology* 2009; 137: 649-659, 659. e1-e2 [PMID: 19445940 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.05.004]
- Lin EH, Jiang Y, Deng Y, Lapsiwala R, Lin T, Blau CA. Cancer stem cells, endothelial progenitors, and mesenchymal stem cells: "seed and soil" theory revisited. *Cancer stem cells, endothelial progenitors, and mesenchymal stem cells: "seed and soil" theory revisited. Gastrointest Cancer Res* 2008; 2: 169-174 [PMID: 19259284]
- Coco C, Zannoni GF, Caredda E, Sioletic S, Boninsegna A, Migaldi M, Rizzo G, Bonetti LR, Genovese G, Stigliano E, Cittadini A, Sgambato A. Increased expression of CD133 and reduced dystroglycan expression are strong predictors of poor outcome in colon cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 71. [Epub ahead of print] [PMID: 22964035]
- Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. Prognostic significance of the cancer stem cell markers

#### ■应用要点

本文通过对不同浓度阿司匹林对人结肠癌细胞株HT-29和SW480中CSCs标志物CD133表达的影响进行研究, 初步探讨阿司匹林对结直肠癌的影响, 为其临床防治结直肠癌提供了新的相关实验依据.



### ■同行评价

本文整体思路清晰, 实验设计合理, 方法学恰当, 具有一定的科学性, 实验结果对临床具有一定指导意义。

- CD133, CD44, and CD166 in colorectal cancer. *Cancer Invest* 2009; 27: 844-850 [PMID: 19626493 DOI: 10.1080/07357900902744502]
- 22 Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP, Stassi G. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 389-402 [PMID: 18371377 DOI: 10.1016/j.stem.2007.08.001]
- 23 Francipane MG, Alea MP, Lombardo Y, Todaro M, Medema JP, Stassi G. Crucial role of interleukin-4 in the survival of colon cancer stem cells. *Cancer Res* 2008; 68: 4022-4025 [PMID: 18519657 DOI: 10.1158/0008-5472.]
- 24 Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007; 445: 111-115 [PMID: 17122771]
- 25 Elsaba TM, Martinez-Pomares L, Robins AR, Crook S, Seth R, Jackson D, McCart A, Silver AR, Tomlinson IP, Ilyas M. The stem cell marker CD133 associates with enhanced colony formation and cell motility in colorectal cancer. *PLoS One* 2010; 5: e10714 [PMID: 20502714 DOI: 10.1371/journal.]
- 26 Kawamoto H, Yuasa T, Kubota Y, Seita M, Sasamoto H, Shahid JM, Hayashi T, Nakahara H, Hassan R, Iwamuro M, Kondo E, Nakaji S, Tanaka N, Kobayashi N. Characteristics of CD133(+) human colon cancer SW620 cells. *Cell Transplant* 2010; 19: 857-864 [PMID: 20587144 DOI: 10.3727/096368910X508988.]
- 27 Lee HN, Park SH, Lee EK, Bernardo R, Kim CW. Proteomic profiling of tumor-initiating cells in HT-29 human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 427: 171-177 [PMID: 22995320 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.09.036]
- 28 Jacobs EJ, Newton CC, Gapstur SM, Thun MJ. Daily aspirin use and cancer mortality in a large US cohort. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 1208-1217 [PMID: 22888140 DOI: 10.1093/jnci/djs318]
- 29 Lou J, Povsic TJ, Allen JD, Adams SD, Myles S, Starr AZ, Ortel TL, Becker RC. The effect of aspirin on endothelial progenitor cell biology: preliminary investigation of novel properties. *Thromb Res* 2010; 126: e175-e179 [PMID: 20659762]
- 30 Mak AB, Nixon AM, Kittanakom S, Stewart JM, Chen GI, Curak J, Gingras AC, Mazitschek R, Neel BG, Stagljar I, Moffat J. Regulation of CD133 by HDAC6 promotes  $\beta$ -catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *Cell Rep* 2012; 2: 951-963 [PMID: 23084749 DOI: 10.1016/j.celrep.2012.09.016]
- 31 安敏, 张振玉. 阿司匹林对肠上皮细胞的损伤作用及机制. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1355-1358
- 32 Zhu L, Gibson P, Currle DS, Tong Y, Richardson RJ, Bayazitov IT, Poppleton H, Zakharenko S, Ellison DW, Gilbertson RJ. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature* 2009; 457: 603-607 [PMID: 19092805 DOI: 10.1038/nature07589]

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

### • 消息 •

## 《世界华人消化杂志》外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标。静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H pylori*不能写成HP, T<sub>1/2</sub>不能写成tl/2或T<sub>1/2</sub>, V<sub>max</sub>不能写Vmax,  $\mu$ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ, Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\varphi$ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T<sub>max</sub>, C<sub>max</sub>, Vd, T<sub>1/2</sub> CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

# Th17细胞及其相关因子在活动期溃疡性结肠炎患者中的表达及意义

张晓斐, 蒋文瑜, 于鹏丽, 李文杰, 张红杰

张晓斐, 蒋文瑜, 于鹏丽, 李文杰, 张红杰, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

张晓斐, 在读硕士, 主要从事炎症性肠病的研究。

作者贡献分布: 此课题由张红杰与张晓斐设计; 研究过程由张晓斐与蒋文瑜完成; 数据分析由张晓斐, 于鹏丽及李文杰完成; 文章由张晓斐撰写; 张红杰提供实验材料, 并审阅论文、指导论文修改。

兴卫工程重点人才基金资助项目, No. RC201163

通讯作者: 张红杰, 主任医师, 副教授, 研究生导师, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科。hjzhang06@163.com

电话: 025-8371-8836

收稿日期: 2012-10-28 修回日期: 2012-12-16

接受日期: 2012-12-28 在线出版日期: 2013-01-08

## Significance of number of Th17 cells and expression of Th17-related cytokines in patients with active ulcerative colitis

Xiao-Fei Zhang, Wen-Yu Jiang, Peng-Li Yu, Wen-Jie Li, Hong-Jie Zhang

Xiao-Fei Zhang, Wen-Yu Jiang, Peng-Li Yu, Wen-Jie Li, Hong-Jie Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: the Health Department Foundation of Jiangsu Province for Key Talents, No. RC201163

Correspondence to: Hong-Jie Zhang, Chief Physician, Associate Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. hjzhang06@163.com

Received: 2012-10-28 Revised: 2012-12-16

Accepted: 2012-12-28 Published online: 2013-01-08

## Abstract

**AIM:** To investigate the association of number of Th17 cells and expression of Th17-related cytokines (IL-17 and IL-21) with disease activity, C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), endoscopic stage, and histological grade in patients with active ulcerative colitis (UC).

**METHODS:** Forty patients with active UC and 20 healthy controls were recruited. The infiltration of Th17 cells in colonic mucosa was assessed

by immunofluorescence. The expression of IL-17 and IL-21 was detected by immunohistochemistry. Serum levels of IL-17 and IL-21 were determined by ELISA.

**RESULTS:** Compared to healthy controls, the number of Th17 cells increased mainly in the lamina propria of active UC patients. The expression of IL-17 and IL-21 in the colonic mucosa and serum levels of these two cytokines in active UC patients were significantly higher than those in normal controls ( $0.0087 \pm 0.0019$  vs  $0.0008 \pm 0.0001$ ,  $P < 0.05$ ;  $0.0082 \pm 0.0017$  vs  $0.0005 \pm 0.0001$ ,  $P < 0.01$ ). The expression of IL-17 and IL-21 was higher in severe UC than in moderate or mild UC ( $0.0020 \pm 0.0004$  vs  $0.0079 \pm 0.0016$  vs  $0.0173 \pm 0.0011$ ;  $0.0020 \pm 0.0004$  vs  $0.0097 \pm 0.0002$  vs  $0.0120 \pm 0.0006$ ). IL-17 and IL-21 expression was positively correlated with CRP, endoscopic stage, and histological grade in patients with active UC (all  $P < 0.05$ ). The expression of IL-17 was also positively correlated with ESR ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The number of Th17 cells and expression of Th17-related cytokines (IL-17 and IL-21) increase in the colonic mucosa of patients with active UC. Th17 cells and Th17-related cytokines may play an important role in disease activity and mucosal damage in patients with active UC.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Ulcerative colitis; Th17; Interleukin-17; Interleukin-21

Zhang XF, Jiang WY, Yu PL, Li WJ, Zhang HJ. Significance of number of Th17 cells and expression of Th17-related cytokines in patients with active ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 19-26

## 摘要

**目的:** 检测Th17细胞及其相关因子白介素17(interleukin-17, IL-17)、IL-21在活动期溃疡

## ■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)的发病与遗传、免疫、微生物及环境等多种因素的相互作用有关,其中免疫异常在UC的发生发展中起重要作用。近年研究发现, Th17细胞及其相关因子IL-17、IL-21在UC患者肠道中高表达,但Th17细胞及其相关因子的增多与UC疾病活动程度以及黏膜损伤程度间的关系尚不明确。

## ■同行评议者

田宇彬, 教授, 青岛大学医学院附属医院

## ■研究前沿

本研究通过检测Th17细胞及其相关因子IL-17、IL-21在活动期UC患者肠黏膜组织中的分布与表达以及血清中IL-17、IL-21的水平,分析Th17细胞及其相关因子IL-17、IL-21的变化与UC疾病活动度、内镜下活动度分级、病理组织学分级以及血沉(ESR)、C反应蛋白(CRP)间的关系。

性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者中的分布与表达,并分析其与疾病活动度、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、内镜下活动度分级以及组织病理分级的关系。

**方法:** 免疫荧光双标法检测40例活动期UC患者及20例健康对照者肠黏膜组织中Th17细胞的分布,免疫组织化学SP法检测上述患者肠黏膜组织中IL-17、IL-21的表达与分布,酶联免疫吸附法检测血清IL-17、IL-21水平。

**结果:** 活动期UC患者肠黏膜固有层中Th17细胞数明显增多。活动期UC患者肠黏膜组织及血清中IL-17、IL-21的表达均明显高于对照组(分别为:  $0.0087 \pm 0.0019$  vs  $0.0008 \pm 0.0001$ ,  $P < 0.05$ ;  $0.0082 \pm 0.0017$  vs  $0.0005 \pm 0.0001$ ,  $P < 0.01$ ),且IL-17、IL-21的表达在轻、中、重度患者间均有显著性差异(分别为:  $0.0020 \pm 0.0004$  vs  $0.0079 \pm 0.0016$  vs  $0.0173 \pm 0.0011$ ;  $0.0020 \pm 0.0004$  vs  $0.0097 \pm 0.0002$  vs  $0.0120 \pm 0.0006$ ),随疾病活动度增加而逐渐增强。IL-17、IL-21的表达与活动期UC患者CRP水平、内镜下活动度分级、组织病理分级均显著正相关( $P < 0.05$ ),IL-17的表达与活动期UC患者的ESR水平显著正相关( $P < 0.05$ )。

**结论:** Th17细胞及其相关因子IL-17、IL-21在活动期UC患者高表达,且随疾病活动程度增加而逐渐增强。Th17细胞及其相关因子与UC的疾病活动与黏膜损伤有关。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; Th17; 白介素17; 白介素21

张晓斐, 蒋文瑜, 于鹏丽, 李文杰, 张红杰. Th17细胞及其相关因子在活动期溃疡性结肠炎患者中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2013; 21(1): 19-26  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/19.asp>

## 0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种慢性非特异性结肠炎症性疾病<sup>[1]</sup>,其病因及发病机制至今尚未完全阐明,与遗传、免疫、微生物及环境等多种因素的相互作用有关<sup>[2]</sup>,其中免疫异常在UC的发生发展中起重要作用。近年研究发现,辅助性T细胞17(T helper 17 cells, Th17)及其分泌的细胞因子如白介素17(interleukin-17, IL-17)、白细胞介素-21(IL-21)等,能够通过对话

应性及先天性免疫系统的调节来诱导炎症反应的发生及肠道黏膜的损伤,从而参与UC的发生发展<sup>[3-5]</sup>。

目前,国外已有研究证实Th17细胞及其相关因子IL-17、IL-21在UC患者肠道中高表达<sup>[6-8]</sup>,但Th17细胞及其相关因子的增多与UC疾病活动程度以及黏膜损伤程度间的关系尚不明确。本研究通过检测Th17细胞及其相关因子IL-17、IL-21在活动期UC患者肠黏膜组织中的分布与表达以及血清中IL-17、IL-21的水平,分析Th17细胞及其相关因子IL-17、IL-21的变化与UC疾病活动度、内镜下活动度分级、病理组织学分级以及血沉(erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C反应蛋白(C reactive protein, CRP)间的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本研究共纳入研究对象60例(UC组40例,健康对照组20例)。UC组为2009-01/2011-12在南京医科大学第一附属医院消化科诊断为活动期UC患者,对照组为肠息肉治疗后复查结肠镜,无异常者。活动期UC患者及健康对照者临床特征见表1,UC患者性别、年龄组成与健康对照组间无明显差异( $P > 0.05$ )。其中UC疾病活动度评分按照Southerland疾病活动指数<sup>[9]</sup>,内镜下UC活动度分级按照改进的Baron内镜下UC活动度分级标准<sup>[10]</sup>,UC病理组织学分级按照病理组织学分级标准<sup>[11]</sup>。UC诊断依据2007年中华医学会消化病学分会IBD协作组“对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见”。此项研究已获我院伦理委员会批准,所有患者及健康对照者标本留取前均签署知情同意书。

## 1.2 方法

**1.2.1 免疫荧光双标染色:** 石蜡切片常规脱蜡至水,微波抗原修复,切片滴加CD4抗体(小鼠抗人,Abcam,英国,浓度1:100)、IL-17抗体(兔抗人,Abcam,英国,浓度1:100)4℃孵育过夜,滴加TRITC标记山羊抗小鼠IgG(Jackson ImmunoResearch,美国,浓度1:100)和FITC标记山羊抗兔IgG(Jackson ImmunoResearch,美国,浓度1:100)室温下孵育2 h后显色。以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)代替一抗作为阴性对照。采用Leica激光共聚焦扫描显微镜观察免疫荧光双标结果并采集图片。

**1.2.2 免疫组织化学染色:** 石蜡切片常规脱蜡至水,用30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>灭活内源性酶10 min。微波炉

表 1 活动期UC患者及健康对照者统计学数据及基本特征

病例特征	对照组(n = 20)	UC组(n = 40)
性别(男/女)	11/9	24/16
平均年龄 ± 标准差 (岁, 年龄范围)	41.2 ± 12.4 (25-64)	34.95 ± 11.1 (21-59)
疾病活动度n(%)		
轻度		12(30.0)
中度		20(50.0)
重度		8(20.0)
内镜下UC活动度分级n(%)		
I级		8(20.0)
II级		10(25.0)
III级		14(35.0)
IV级		8(20.0)
病理组织学分级n(%)		
I级		8(20.0)
II级		12(30.0)
III级		12(30.0)
IV级		8(20.0)

表 2 Th17细胞相关因子在不同活动程度UC的阳性细胞百分比 (%)

分组	IL-17	IL-21
对照组	3.2 ± 0.2	2.8 ± 0.4
UC组	15.9 ± 2.0 <sup>a</sup>	25.9 ± 1.3 <sup>a</sup>
轻度	9.5 ± 1.9 <sup>a</sup>	22.3 ± 0.9 <sup>a</sup>
中度	18.0 ± 1.0 <sup>ac</sup>	25.8 ± 0.6 <sup>ac</sup>
重度	23.4 ± 0.7 <sup>ace</sup>	29.1 ± 0.3 <sup>ace</sup>

<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组; <sup>b</sup>P<0.05 vs 轻度组; <sup>c</sup>P<0.05 vs 中度组.

样本均数的t检验(Student's *t*-test)进行活动期UC与对照组肠黏膜组织及血清IL-17、IL-21表达水平的比较; 用单因素方差分析(one way ANOVA)进行活动期UC轻、中、重3组间的比较; CRP、ESR分别与肠黏膜组织及血清IL-17、IL-21表达水平相关性的分析采用Pearson相关分析; 活动期UC内镜下活动度分级、病理组织学分级分别与肠黏膜组织及血清IL-17、IL-21表达水平相关性的分析采用Spearman相关分析, 所有的检验均以P<0.05为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 Th17细胞在活动期UC患者肠黏膜组织中的分布 免疫荧光双标记结果显示, CD4+IL-17+细胞(Th17细胞)主要分布于黏膜固有层, 活动期UC患者肠黏膜组织中的CD4+IL-17+细胞数明显增多, 而对照组中CD4+IL-17+细胞数极少(图1).

2.2 Th17细胞相关因子在活动期UC患者肠黏膜组织中的分布与表达 免疫组织化学染色结果显示, IL-17、IL-21阳性颗粒主要分布于黏膜固有层单个核细胞胞质中, 颗粒呈棕黄色; 活动期UC患者肠黏膜组织中IL-17、IL-21的阳性表达明显高于对照组(图2).

2.3 Th17细胞相关因子在UC疾病活动程度不同患者肠黏膜组织中的表达 活动期UC患者肠黏膜组织中IL-17、IL-21阳性细胞百分比均明显高于对照组(P<0.01). 活动期UC轻、中、重度3组IL-17及IL-21阳性细胞百分比均随疾病活动度增加而明显增加, 且组间比较均有显著性差异(P<0.01, 表2).

IL-17、IL-21在活动期UC患者肠黏膜组织中表达的平均吸光度明显高于对照组(分别为: 0.0087 ± 0.0019 vs 0.0008 ± 0.0001, P<0.05; 0.0082 ± 0.0017 vs 0.0005 ± 0.0001, P<0.01, 图

## ■ 相关报道

Fujino等研究显示, IL-17+细胞主要分布于活动期UC患者肠黏膜组织中, 其数量显著多于缓解期UC患者. 同时, 活动期UC患者血清IL-17水平明显高于健康对照组. Yamamoto-Furusho等在对活动期UC患者直肠黏膜组织标本中IL-6、IL-21 mRNA表达水平的检测中发现, 与对照组及缓解期UC患者相比, IL-21的mRNA表达量显著增高, 且与组织学水平的疾病活动有关.

枸橼酸盐缓冲液抗原修复后, 免疫组织化学染色方法参照SP试剂盒产品说明书操作流程依次进行, 以PBS替代一抗作阴性对照. DAB显色后, 苏木素复染、脱水、透明、封片, 显微镜下观察. 免疫组织化学试剂分别为IL-17抗体(兔抗人, Abcam, 浓度1:100)、IL-21抗体(兔抗人, Millipore, 美国, 浓度1:100)、SP免疫组织化学试剂盒(福建迈新公司). 结果判断及评估: 胞质染色呈棕黄色为阳性细胞. 参照文献提供的方法对免疫组织化学结果进行评估<sup>[12-14]</sup>: (1)阳性细胞百分比: 每个样本随机选取5个高倍镜视野(×400), 计数肠黏膜固有层中细胞总数/阳性细胞数, 取均值; (2)平均光密度: 每个样本随机选取5个高倍镜视野(×400), 采用Image-Pro Plus图像分析软件(Version 6.0, Media Cybernetics, 美国), 计算平均光密度并取均值, 对各细胞因子在活动期UC患者肠黏膜组织中的蛋白表达程度进行半定量.

1.2.3 酶联免疫吸附(ELISA)法: UC组及对照组均于肠镜检查次日清晨空腹抽取肘静脉血, 离心后分离血清, 于-80℃冰箱中保存备检. 分别使用IL-17、IL-21 ELISA试剂盒(eBioscience, 美国)检测血清中IL-17、IL-21的水平. 操作过程严格按照试剂盒说明进行, 采用EXCEL软件绘制标准曲线, 计算血清中IL-17、IL-21的含量.

统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行统计学分析, 计量资料以mean ± SD表示, 用两独立

### ■ 创新盘点

已有研究显示 IL-17、IL-21 这两种细胞因子在 UC 患者均呈高表达, 但他们表达水平的变化与 UC 疾病活动程度以及黏膜损伤程度是否有关, 尚无明确阐述. 本研究发现, IL-17、IL-21 不仅在活动期 UC 患者肠黏膜组织及血清中表达显著高于健康对照组, 而且随疾病活动度增加而逐渐增强.

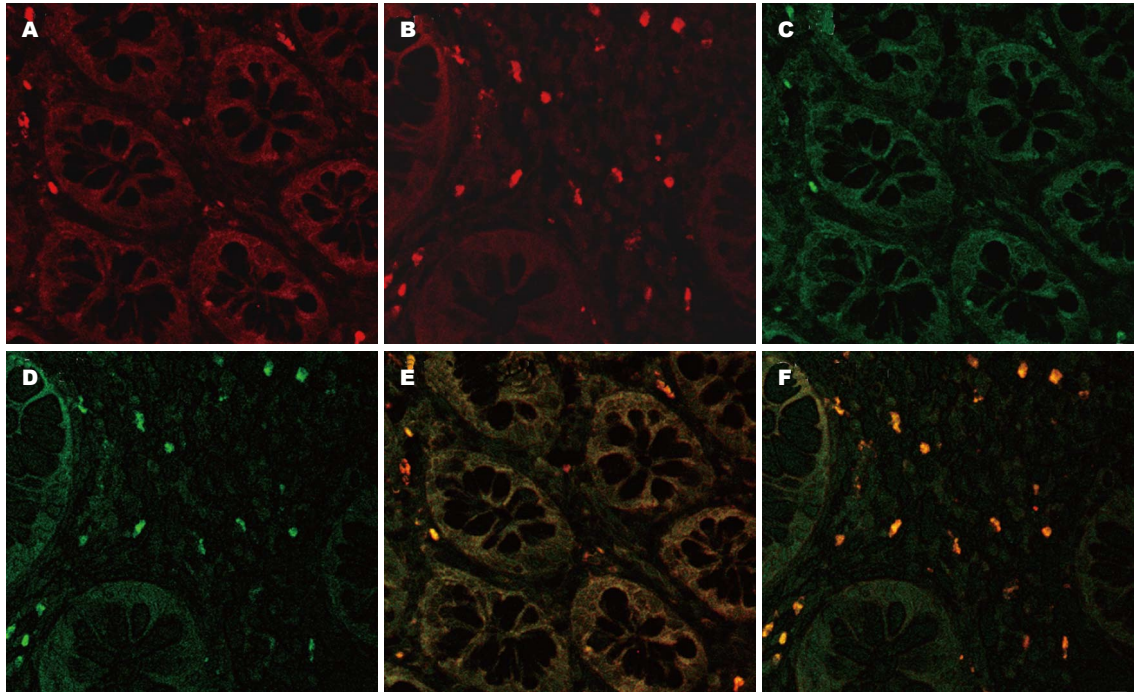


图 1 免疫荧光双标检测 Th17 细胞在结肠黏膜中的分布 ( $\times 400$ ). A, C, E: 对照组; B, D, F: UC 组; A, B: CD4 在结肠黏膜中的表达; C, D: IL-17 在结肠黏膜中的表达; E, F: CD4、IL-17 在结肠黏膜中的共表达; A, B: CD4; C, D: IL-17; E, F: CD4/IL-17.

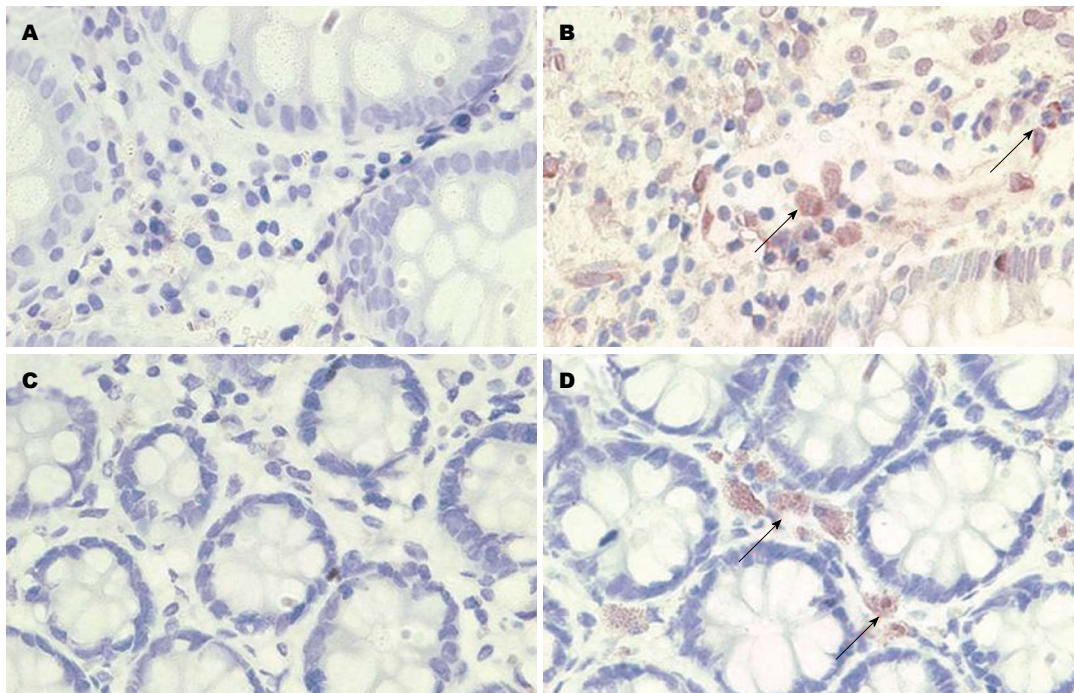
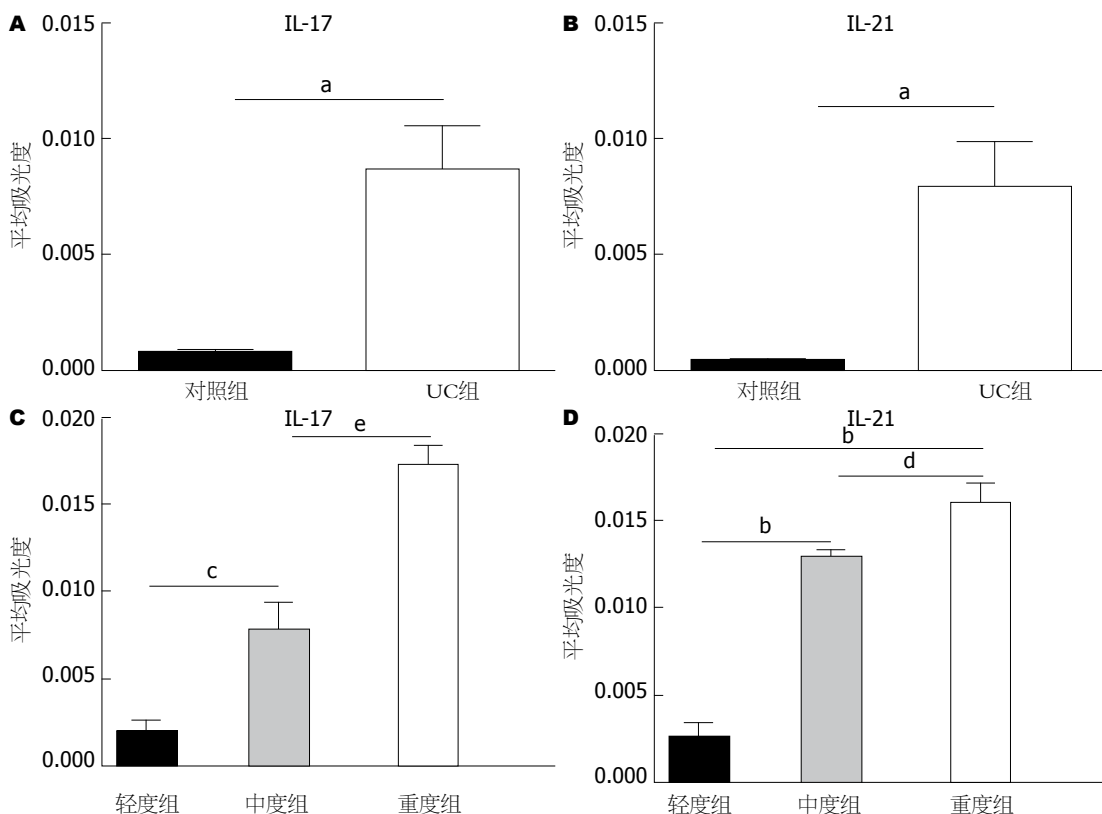


图 2 免疫组织化学 SP 法检测 IL-17、IL-21 在结肠黏膜中的表达 ( $\times 400$ ). A, C: 对照组; B, D: UC 组; A, B: IL-17 在结肠黏膜中的表达; C, D: IL-21 在结肠黏膜中的表达.

3A, B). IL-17 和 IL-21 在活动期 UC 轻、中、重度 3 组表达的平均吸光度随疾病活动度增加而明显增加 (分别为:  $0.0020 \pm 0.0004$  vs  $0.0079 \pm 0.0016$  vs  $0.0173 \pm 0.0011$ ;  $0.0020 \pm 0.0004$  vs  $0.0097 \pm 0.0002$  vs  $0.0120 \pm 0.0006$ ), 且组间比较均有显著性差异 ( $P < 0.05$ , 图 3C, D).

2.4 Th17 细胞相关因子在 UC 不同疾病活动度患者血清中的表达 活动期 UC 患者血清中 IL-17、IL-21 水平均明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ). 活动期 UC 轻、中、重度 3 组血清 IL-17、IL-21 水平随疾病活动度增加而明显增加, 组间比较均有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 其中, 轻度组 IL-17、IL-21 水



**应用要点**  
 活动期UC患者肠黏膜组织以及血清中IL-17、IL-21的表达随内镜下活动度分级、病理组织学分级的升高而逐渐增加,与疾病活动及黏膜损伤有关,在UC的发生发展中可能具有重要作用,其具体机制有待进一步研究。

图 3 平均吸光度分析IL-17、IL-21在活动期UC患者肠黏膜的表达水平. A, B: 对照组与UC组的比较; C, D: UC患者轻、中、重度3组间的比较( $P < 0.05$  vs 对照组;  $^b P < 0.05$ ,  $^c P < 0.01$  vs 轻度组;  $^d P < 0.05$ ,  $^e P < 0.01$  vs 中度组).

表 3 不同活动程度UC血清中Th17细胞相关因子水平的比较 (pg/mL)

分组	IL-17	IL-21
对照组	9.80 ± 1.49	200.73 ± 24.73
UC组	11.60 ± 1.15 <sup>a</sup>	249.96 ± 29.75 <sup>a</sup>
轻度	10.42 ± 0.44	217.47 ± 26.26
中度	11.44 ± 0.63 <sup>bc</sup>	249.37 ± 8.66 <sup>bc</sup>
重度	13.04 ± 0.61 <sup>abc</sup>	283.45 ± 17.84 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 轻度组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 中度组.

平虽高于对照组,但两者间差异无统计学意义( $P > 0.05$ , 表3).

2.5 Th17细胞相关因子表达与活动期UC患者CRP、ESR的相关性分析 以平均光密度表示活动期UC患者肠黏膜组织中IL-17、IL-21的表达,发现活动期UC患者肠黏膜组织中IL-17平均光密度与CRP和ESR水平均显著正相关( $P < 0.05$ ); IL-21平均光密度与CRP水平也呈显著正相关( $P < 0.01$ ),但与ESR间无显著相关性( $P > 0.05$ , 表4).

活动期UC患者血清IL-17水平也与CRP和ESR水平均显著正相关( $P < 0.05$ ); 血清IL-21水平

与CRP水平也呈显著正相关( $P < 0.01$ ),与ESR间仍无显著相关性( $P > 0.05$ , 表4).

2.6 Th17细胞相关因子表达与活动期UC内镜下及组织学表现的相关性分析 活动期UC患者肠黏膜组织中IL-17、IL-21表达的平均光密度,与内镜下活动度分级、病理组织学分级均显著正相关( $P < 0.01$ , 表5); 活动期UC患者血清IL-17、IL-21水平,与内镜下活动度分级、病理组织学分级亦呈显著正相关( $P < 0.01$ , 表5).

### 3 讨论

Th17细胞是近来发现的一种不同于Th1、Th2细胞的新的辅助性T细胞亚群,因其能够特异性分泌IL-17而命名, Th17尚能分泌IL-6、IL-21、IL-22、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等多种细胞因子<sup>[15]</sup>. 研究证实<sup>[16-18]</sup>, Th17细胞及其相关因子与多发性硬化症、类风湿性关节炎等多种炎症反应及自身免疫相关性疾病的发生发展有关. 其中, IL-17可诱导与炎症相关的多个基因的表达(包括IL6、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子、细胞间黏附分子1等)<sup>[19-21]</sup>, 增强白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )及TNF- $\alpha$ 诱导的炎症反应, 还

■同行评价  
本文有一定的先  
进性和科学性。

表 4 Th17细胞相关因子的表达与CRP、ESR的相关性分析 ( $n = 40$ )

	CRP		ESR	
	Pearson相关系数( $r$ )	$P$	Pearson相关系数( $r$ )	$P$
组织水平(平均吸光度)				
IL-17	0.912	0.000	0.642	0.033
IL-21	0.751	0.008	0.359	0.278
血清水平(Elisa)				
IL-17	0.978	0.000	0.788	0.004
IL-21	0.827	0.002	0.600	0.051

表 5 Th17细胞相关因子的表达与内镜下及组织学表现的相关性分析 ( $n = 40$ )

	内镜下活动度分级		病理组织学分级	
	Spearman相关系数( $r$ )	$P$	Spearman相关系数( $r$ )	$P$
组织水平(平均吸光度)				
IL-17	0.902	0.000	0.906	0.000
IL-21	0.864	0.001	0.812	0.002
血清水平(Elisa)				
IL-17	0.935	0.000	0.878	0.000
IL-21	0.864	0.001	0.751	0.008

可通过诱导巨噬细胞产生促炎症细胞因子, 建立适应性及先天性免疫的联系<sup>[3,22,23]</sup>, 在各种组织的炎症反应中发挥重要的调节作用. IL-21能够调节T细胞的分化和功能, 增加抗原激活的CD4+和CD8+T细胞的扩增, 诱导白细胞介素-12受体(IL-12R), 白介素-18受体(IL-18R), 干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ), 白介素-2受体 $\alpha$ (IL-2R $\alpha$ )的基因编码<sup>[4]</sup>, 还可介导T细胞向肠道炎症部位聚集以及引起肠道成纤维细胞分泌基质降解酶<sup>[24]</sup>. Th17细胞通过分泌IL-17、IL-21等相关因子所产生的对免疫系统的调节作用及其对促炎因子的诱导作用, 介导了肠道炎症反应的发生及黏膜的损伤.

有研究结果显示, 活动期UC患者外周血中Th17细胞数量明显增多<sup>[25,26]</sup>. 本研究通过免疫荧光双标记的方法, 发现与对照组相比, 活动期UC患者肠黏膜组织中CD4+IL-17+细胞(即Th17细胞)明显增多, 提示Th17细胞可能参与UC患者肠黏膜的免疫炎症反应过程.

Fujino等<sup>[6]</sup>研究显示, IL-17阳性细胞主要分布于活动期UC患者肠黏膜组织中, 其数量显著多于缓解期UC患者, 并且在缺血性肠病、感染性结肠炎及健康对照组中无阳性表达; 同时, 活动期UC患者血清IL-17水平明显高于健康对照组. Yamamoto-Furusho等<sup>[27]</sup>在对活动期UC患者直肠黏膜组织标本中IL-6、IL-21 mRNA表达水平

的检测中发现, 与对照组及缓解期UC患者相比, IL-21的mRNA表达量显著增高, 且与组织学水平的疾病活动有关, 但并没有对IL-21蛋白表达在肠黏膜组织中的分布, 以及与疾病活动情况的相关性进行研究. 这两种细胞因子在UC患者均呈高表达, 但他们表达水平的变化与UC疾病活动程度以及黏膜损伤程度是否有关, 尚无明确阐述. 本研究发现, IL-17、IL-21不仅在活动期UC患者肠黏膜组织及血清中表达显著高于健康对照组, 而且随疾病活动度增加而逐渐增强.

UC的发病是一种慢性炎症过程, 但其急性活动期的表现类似于急性时相反应, CRP及ESR的水平均会在此炎症过程中发生改变, 可在一定程度上反应UC的疾病活动程度<sup>[28,29]</sup>. 我们在对Th17细胞相关因子的表达水平与活动期UC患者CRP及ESR水平的相关性分析中发现, IL-17、IL-21的表达随CRP水平的增高而逐渐增高. 可见, Th17相关因子与疾病的活动密切相关. UC内镜下活动度分级及病理组织学分级能够有效反映疾病活动程度及黏膜损伤程度. 活动性UC患者肠黏膜组织中Th17细胞增多, 其相关细胞因子IL-17及IL-21表达增加与内镜下黏膜损伤及组织学表现间有着怎样的关系? 我们在对Th17细胞相关因子的表达水平与活动期UC患者内镜下活动度分级及病理组织学分级的相关

性分析中发现, 活动期UC患者肠黏膜组织以及血清中IL-17、IL-21的表达随内镜下活动度分级、病理组织学分级的升高而逐渐增加, 与疾病活动及黏膜损伤有关。

总之, Th17细胞相关因子在活动期UC患者肠黏膜及血清中高表达, 且随疾病活动度、CRP、ESR水平以及内镜下活动度分级、病理组织学分级的增加而逐渐增强。Th17细胞及其相关因子与UC疾病活动程度、肠道黏膜损伤程度密切相关, 在UC的发生发展中可能具有重要作用, 其具体机制有待进一步研究。

#### 4 参考文献

- Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2011; 365: 1713-1725 [PMID: 22047562 DOI: 10.1056/NEJMra1102942.]
- Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 573-621 [PMID: 20192811 DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101225.]
- Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-476 [PMID: 15485625]
- Strengell M, Sareneva T, Foster D, Julkunen I, Matikainen S. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. *J Immunol* 2002; 169: 3600-3605 [PMID: 12244150]
- Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1756-1767 [PMID: 21530742 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.02.016.]
- Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 65-70 [PMID: 12477762]
- Fantini MC, Monteleone G, MacDonald TT. IL-21 comes of age as a regulator of effector T cells in the gut. *Mucosal Immunol* 2008; 1: 110-115 [PMID: 19079168 DOI: 10.1038/mi.2007.17.]
- Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, Tsujikawa T, Kitoh K, Kim-Mitsuyama S, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005; 129: 969-984 [PMID: 16143135]
- Sutherland LR, Martin F. 5-Aminosalicylic acid enemas in treatment of distal ulcerative colitis and proctitis in Canada. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 64S-66S [PMID: 3319459]
- Jun S, Hua RZ, Lu TJ, Xiang C, Dong XS. Are endoscopic grading and scoring systems in inflammatory bowel disease the same? *Saudi Med J* 2008; 29: 1432-1437 [PMID: 18946568]
- Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, Mani V, Morris JS, Williams GT, Newcombe RG, Russell MA, Feyeraend C, Thomas GA. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1994; 330: 811-815 [PMID: 8114833]
- Sun Y, Zhang D, Wang CF, Hu SW, Lan Z. [The expression and significance of TGF-beta 1 and its receptors in infertile women's fimbriae tubes with adhesions and atresias]. *Sichuan Daxue Xuebao Yi xueban* 2009; 40: 435-438 [PMID: 19626999]
- Prasad K, Prabhu GK. Image analysis tools for evaluation of microscopic views of immunohistochemically stained specimen in medical research-a review. *J Med Syst* 2012; 36: 2621-2631 [PMID: 21584771 DOI: 10.1007/s10916-011-9737-7.]
- Bai A, Lu N, Guo Y, Liu Z, Chen J, Peng Z. All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 959-969 [PMID: 19477911 DOI: 10.1189/jlb.0109006.]
- Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect* 2009; 11: 625-630 [PMID: 19371791 DOI: 10.1016/j.micinf.2009.04.003.]
- Raza A, Yousaf W, Giannella R, Shata MT. Th17 cells: interactions with predisposing factors in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2012; 8: 161-168 [PMID: 22288454 DOI: 10.1586/eci.11.96.]
- Niu Q, Cai B, Huang ZC, Shi YY, Wang LL. Disturbed Th17/Treg balance in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2012; 32: 2731-2736 [PMID: 21809006 DOI: 10.1007/s00296-011-1984-x.]
- Becher B, Segal BM. T(H)17 cytokines in autoimmune neuro-inflammation. *Curr Opin Immunol* 2011; 23: 707-712 [PMID: 21907555 DOI: 10.1016/j.coi.2011.08.005.]
- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996; 183: 2593-2603 [PMID: 8676080]
- Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P. Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* 1998; 161: 409-414 [PMID: 9647250]
- Cai XY, Gommoll CP, Justice L, Narula SK, Fine JS. Regulation of granulocyte colony-stimulating factor gene expression by interleukin-17. *Immunol Lett* 1998; 62: 51-58 [PMID: 9672148]
- Katz Y, Nadiv O, Beer Y. Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2176-2184 [PMID: 11592383]
- LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP, Guilak F. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2078-2083 [PMID: 11592370]
- Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008; 454: 350-352 [PMID: 18469800 DOI: 10.1038/nature07021.]
- Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S. Foxp3+ regulatory T cells, Th17



- effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 2010; 30: 80-89 [PMID: 19936899 DOI: 10.1007/s10875-009-9345-1.]
- 26 Beltrán CJ, Candia E, Erranz B, Figueroa C, Gonzalez MJ, Quera R, Hermoso MA. Peripheral cytokine profile in Chilean patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur Cytokine Netw* 2009; 20: 33-38 [PMID: 19318319 DOI: 10.1684/ecn.2009.0142.]
- 27 Yamamoto-Furusho JK, Miranda-Pérez E, Fonseca-Camarillo G, Sánchez-Muñoz F, Barreto-Zuñiga R, Dominguez-Lopez A. Interleukin 21 expression is increased in rectal biopsies from patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16: 1090 [PMID: 19998455 DOI: 10.1002/ibd.21135.]
- 28 Solem CA, Loftus EV, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 707-712 [PMID: 16043984]
- 29 Cabrera-Abreu JC, Davies P, Matek Z, Murphy MS. Performance of blood tests in diagnosis of inflammatory bowel disease in a specialist clinic. *Arch Dis Child* 2004; 89: 69-71 [PMID: 14709513]

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》修回稿须知

**本刊讯** 为了保证作者来稿及时发表,同时保护作者与《世界华人消化杂志》的合法权益,本刊对修回稿要求如下。

#### 1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表,所有作者均符合作者条件,所有作者均同意该文代表其真实研究成果,保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件;通讯作者应负责与其他作者联系,修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信,保证无泄密,如果是几个单位合作的论文,则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部。

#### 2 稿件修改

来稿经同行专家审查后,认为内容需要修改、补充或删除时,本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改,而作者必须于15天内将单位介绍信、作者复核要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部,同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统;逾期发回的,作重新投稿处理。

#### 3 版权

本论文发表后作者享有非专有权,文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流,但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年;卷(期):起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动,须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意,其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布;作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。

## 动物腹泻性疾病—现状、进展与展望

任晓峰, 陈刚, 李伟, 张阳, 吴昊, 施慈, 赵凯, 王靓靓, 李训良, 李鹏冲, 殷相平, 柳纪省, 茅翔, 范京惠, 左玉柱, 赵高伟, 仇铮, 崔尚金, 杨青

**编者按** “国以民为本, 民以食为天”, 随着中国经济的高速发展, 我国人民生活水平得到显著提高. 但由于多种动物病原体的不断出现和变异, 对我国畜禽业发展造成了严重危害, 在一定程度上对国民生活和健康产生了潜在影响. 多种病原如细菌或病毒可造成动物腹泻性疾病, 此类疾病的感染主要靶器官是消化道和胃肠道, 导致动物营养吸收障碍, 肠内容物增多, 出现呕吐、腹泻和脱水等临床症状, 幼龄动物死亡率极高. 尤其是病毒性腹泻疾病因常规抗生素治疗无效而产生更严重的危害.

病毒性腹泻病原体主要有属于冠状病毒科的猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和属于轮状病毒科的猪轮状病毒, 但另外一些动物病毒如猪细小病毒也可导致腹泻症状. 这些病毒尽管导致相似的临床症状, 但他们在病毒基因结构、细胞受体类型和致病机理等方面却不尽相同. 特别最近两年, 我国大部分地区均有猪病毒性腹泻病的爆发, 提醒我们应该对此类疾病的研究给予更大的重视.

在兽医科研人员的努力下, 动物腹泻性疾病的致病机理研究、诊断技术、预防手段和疫苗研制方面已经取得了一定的进展. 本焦点论坛邀请我国从事该类疾病相关研究的兽医专家对TGEV、PEDV、PRV、PPV以及禽大肠杆菌的感染特性、细胞受体功能区鉴定、病原结构蛋白功能研究进展、生物新技术对检测方法发展的影响以及包括合成肽、转基因植物和纳米材料基础的新型疫苗效果评价等方面进行综述. 一方面可为动物腹泻性疾病的预防与治疗提供理论指导; 另一方面, 由于部分动物腹泻病原, 例如PRV, 与人类相似病原体有一些共同的特性, 所以编者和本专辑所有作者希望本焦点论坛文献在能为人医同行提供参考借鉴的同时引起医学研究者的共鸣, 为此类疾病研究开展更广泛的交流并提供更好的建议; 通过我们共同的努力及早有效地控制动物腹泻性疾病的发生, 为更好地为保障人类生活健康服务.

1	猪流行性腹泻的研究进展.....	28
2	猪流行性腹泻的诊断与预防.....	33
3	猪传染性胃肠炎病毒致病机制的研究进展.....	39
4	猪流行性腹泻病毒蛋白结构与功能的初探.....	44
5	猪流行性腹泻病毒的基因结构及其诊断技术.....	54
6	轮状病毒感染机制及防治的研究进展.....	60
7	猪细小病毒的致病机制与防控策略.....	66
8	纳米氧化物材料在仔猪抗腹泻中的应用.....	71

## 猪流行性腹泻的研究进展

陈刚, 李伟, 张阳, 吴昊, 施慈, 任晓峰, 赵凯

### ■背景资料

近年来,猪流行性腹泻(PED)的流行区域和流行强度有不断扩大和增强的趋势,对哺乳仔猪造成很高的致死率,给养猪业造成了很大的经济损失。PED是由PEDV引起的猪的一种急性接触性肠道传染病,以呕吐、腹泻、食欲下降和脱水为基本特征,各种年龄的猪均易感染,发病率达100%,尤以哺乳仔猪受害最重,本病的发生具有一定的季节性,多发生于冬季。

陈刚,李伟,张阳,吴昊,施慈,赵凯,黑龙江大学生命科学学院 微生物黑龙江省高校重点实验室 黑龙江省哈尔滨市 150080

陈刚,上海兽用生物制品工程技术中心 上海海利生物技术股份有限公司 上海市 201403

任晓峰,东北农业大学动物医学学院预防兽医系 黑龙江省哈尔滨市 150030

陈刚,在读硕士,主要从事动物疫苗黏膜免疫递送系统方面的研究。国家国际科技合作专项基金资助项目, No. 2012DFA30250 “十一五”国家科技部支撑计划重大项目子课题基金资助项目, No. BAD06A03

国家自然科学基金资助项目, No. 31072119

教育部科学技术研究重点基金资助项目, No. 212048

哈尔滨市科技攻关计划基金资助项目, No. 2009AA6CN125 哈尔滨市科技创新人才研究专项基金资助项目, No.

2010RFQXN091, No. 2011RFQXN039

黑龙江省教育厅面上基金资助项目, No. 12521408

作者贡献分布:文献检索、资料分析由陈刚、李伟、张阳及吴昊完成;论文撰写由陈刚与李伟完成;文字校对和排版由施慈完成;选题和审校由赵凯、陈刚及任晓峰完成。

通讯作者:赵凯,教授,150080,黑龙江哈尔滨市南岗区学府路74号,黑龙江大学生命科学学院,微生物黑龙江省高校重点实验室。zk395@yahoo.com.cn

电话:0451-86609046

收稿日期:2012-09-17 修回日期:2012-12-30

接受日期:2013-01-05 在线出版日期:2013-01-08

### Progress in research of porcine epidemic diarrhea

Gang Chen, Wei Li, Yang Zhang, Hao Wu, Ci Shi, Xiao-Feng Ren, Kai Zhao

Gang Chen, Wei Li, Yang Zhang, Hao Wu, Ci Shi, Kai Zhao, Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, Heilongjiang Province, China

Gang Chen, Shanghai Engineering Center of Veterinary Biological Products, Shanghai HILE Bio-pharmaceutical Co, Ltd. Shanghai 201403, China

Xiao-Feng Ren, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Program for International Science and Technology Cooperation Projects of China, No. 2012DFA30250; the Major Project of the National Key Technology R&D Program during the “Eleventh Five-year Plan” Period, No. BAD06A03; the National Natural Science Foundation of China, No. 31072119; the Key Science and Technology Project of Chinese Ministry of Education, No. 212048; the Key Scientific and Technological Project of Harbin, No. 2009AA6CN125; the Scientific and Technological Innovation Talent Foundation of Harbin, Nos. 2010RFQXN091 and 2011RFQXN039; and the General Project of Science and Technology Research Foundation of Education Department of Heilongjiang Province, No. 12521408

Correspondence to: Kai Zhao, Professor, Laboratory of Microbiology, College of Life Science, Heilongjiang Uni-

versity, Harbin150080, Heilongjiang Province, China. zk395@yahoo.com.cn

Received: 2012-09-17 Revised: 2012-12-30

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-08

### Abstract

Porcine epidemic diarrhea (PED) is a highly contagious, enteric swine disease caused by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), which is characterized by severe enteritis with vomiting, acute diarrhea, anorexia, and dehydration. In recent years, the epidemic area and intensity of PED have continuously enlarged, causing a significantly high mortality of suckling piglets and huge economic losses in pig industry. This paper summarizes the etiology, pathogenesis, diagnosis, and prevention of PED.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Porcine epidemic diarrhea; Etiology; Pathogenesis; Diagnosis; Prevention

Chen G, Li W, Zhang Y, Wu H, Shi C, Ren XF, Zhao K. Progress in research of porcine epidemic diarrhea. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 28-32

### 摘要

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的猪的一种急性接触性肠道传染病,以呕吐、腹泻、食欲下降和脱水为基本特征。近年来,该病的流行区域和强度有不断扩大和增强的趋势,对哺乳仔猪造成了很高的致死率,给养猪业造成了很大经济损失。为了能有效防制PED,本文就PED病原学、发病机制、诊断和预防等方面的研究进展做一概述。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词:猪流行性腹泻;病原学;发病机制;诊断;预防

陈刚,李伟,张阳,吴昊,施慈,任晓峰,赵凯.猪流行性腹泻的研究进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21(1): 28-32  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/28.asp>

### ■同行评议者

李君文,研究员,中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所

## 0 引言

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的猪的一种急性接触性肠道传染病,以呕吐、腹泻、食欲下降和脱水为基本特征,各种年龄的猪均易感染,发病率达100%,尤以哺乳仔猪受害最重,本病的发生具有一定的季节性,多发生于冬季<sup>[1,2]</sup>。病毒存在于肠绒毛和肠系膜淋巴结中,随粪便排出,病猪是主要的传染源,感染的途径是胃肠道。本病的流行特点、临床症状和病理变化都与猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis of swine, TGE)十分相似,但哺乳仔猪死亡率较低,在猪群中的传播速度相对较慢。通过仔猪接种、直接免疫荧光、免疫电镜和中和试验,证明PEDV与TGE病毒在抗原上有明显差异。

PED于1971年首次在英国发现,主要引起架子猪和育肥猪急性腹泻,当时称为猪流行性病毒性腹泻(epidemic viral diarrhea, EDV)。1982年将该病统一命名为“猪流行性腹泻”。该病在许多国家如比利时、荷兰、德国、法国、瑞士、保加利亚、匈牙利、前苏联、日本及韩国均有发生。PEDV在亚洲与欧洲的致病情况有所差异,在欧洲地区, PEDV主要引起较大日龄猪的腹泻(6-15周龄),造成感染猪群较轻微腹泻流行,并在1 wk后很快康复,一般不造成很大的损失。而在亚洲地区, PEDV引起的仔猪死亡率较高,并且在我国PEDV感染更加严重<sup>[3]</sup>。我国自20世纪80年代以来陆续有本病的报道,并分离到病毒,之后PED在我国绝大多数省市自治区广泛流行。近年来,该病的流行区域和流行强度有不断扩大和增强的趋势,对哺乳仔猪造成很高的致死率,给养猪业造成了很大的经济损失<sup>[4-6]</sup>。

## 1 病原学

PEDV为套式病毒目(*Nidovirales*)冠状病毒科(*Coronaviridae*)冠状病毒属(*Coronavirus*)的成员。病毒粒子略呈球形,在粪便中的病毒粒子长呈多态形,直径约95-190 nm,平均直径为130 nm,有囊膜,囊膜上有花瓣状纤突,长12-24 nm,由核心向四周放射,其间距较大且排列规则,呈皇冠状。病毒核酸为线性单股正链RNA,具有侵染性。基因组全长为27 000-33 000个核苷酸,相对分子量为 $6 \times 10^6$ - $8 \times 10^6$ 。基因组5'端有帽子结构,3'端有PolyA尾,具有Kozak序列,基因组序列包括6个ORF,从5'到3'端依次是*Po1*基因、*S*基因、*ORF3*

基因、*sM*基因、*M*基因、*N*基因,分别编码复制多聚蛋白lab(plab)、纤突蛋白(S)、ORF3蛋白、小膜蛋白(E)、膜糖蛋白(M)和核衣壳蛋白(N)<sup>[7]</sup>。

免疫荧光和免疫电镜试验表明, PEDV与鸡传染性支气管炎病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒、新生犊牛腹泻冠状病毒、犬冠状病毒、猫传染性腹膜炎冠状病毒之间没有抗原相关性<sup>[8]</sup>。中和试验和ELISA等都证明PEDV和TGEV在抗原性上不同,无共同抗原。目前,尚无迹象表明存在不同的PED血清型,所有分离的PEDV毒株属于同一个血清型。PEDV不能凝集家兔、小鼠、豚鼠、猪、牛、羊、雏鸡和人的红细胞。一般消毒药物都可将其杀灭。PEDV对外界抵抗力较弱,对乙醚和氯仿敏感,一般消毒药物都可将其杀灭。病毒在60 °C 30 min,可失去感染力,但在50 °C条件下相当稳定。病毒在4 °C pH 5.0-9.0或在37 °C pH 6.5-7.5时稳定。

最初, PEDV增值是经口腔接种仔猪完成的。病毒只能在肠上皮组织培养物内生长<sup>[9]</sup>。由于在细胞培养液中加入犊牛血清会抑制PEDV与红细胞受体的结合,故该细胞的细胞培养很长一段时间内未获得成功。后来发现Vero细胞(非洲绿猴肾细胞)有利于PEDV的持续增值,病毒生长依赖于无血清细胞培养液中的胰蛋白酶<sup>[10]</sup>。细胞病变(cell elongating factor, CEF)包括空胞化和形成合胞体。

## 2 发病机制

病毒经口鼻感染,侵入小肠后,在小肠和结肠绒毛吸收上皮细胞浆内通过内质网膜以出芽方式增值,在复制过程中损伤细胞器,继而出现细胞功能障碍,因线粒体肿胀引起细胞数量减少,营养物质吸收不良,这是绒毛萎缩前发生腹泻的主要原因<sup>[11]</sup>。随着病程的发展,吸收上皮损伤逐渐加重,直至上皮脱落,形成绒毛萎缩、变短,吸收面积减少<sup>[12]</sup>。引起吸收营养物质的机能显著障碍,另一方面由于肠黏膜上皮细胞内各种酶活性显著降低或缺乏,蛋白质、糖、脂肪不能彻底被分解,使肠内物质腐败发酵,刺激肠末梢感受器,蠕动增强,加之ATP酶活性降低或缺乏,肠上皮细胞内钠泵失活,又可造成晶体渗透压升高,最终导致仔猪发生渗透性腹泻。仔猪由于肠内碱性物质大量排出,而引起酸中毒、自体中毒、脱水和贫血,发生败血性休克衰竭而死<sup>[9,13]</sup>。

## 3 诊断

病猪表现为呕吐、迅速腹泻脱水、精神萎顿、

## ■ 研发前沿

虽然灭活疫苗具有安全、稳定的优点,但同时具有免疫期短,免疫剂量大等缺点,且灭活苗只能通过注射免疫,仔猪无法获得sIgA,保护效果不佳。而弱毒苗由于存在成本高、易返祖、有潜在感染危险等缺陷,很难在实践中推广应用。

### ■相关报道

免疫荧光和免疫电镜试验表明, PEDV与鸡传染性支气管炎病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒、新生犊牛腹冠冠状病毒、犬冠状病毒、猫传染性腹膜炎冠状病毒之间没有抗原相关性。

食欲下降. 病变区域局限在小肠, 肠管膨满扩张, 肠壁透明, 肠系膜充血, 肠系膜淋巴结水肿. 病理组织学变化表现为上皮细胞变性、坏死和脱落, 感染的上皮细胞, 电镜观察可见微绒毛缩短或减少, 细胞浆破裂, 在胞浆的空腔内或滑面内质网中可见到病毒粒子<sup>[14]</sup>. 超微结构变化主要发生于小肠细胞胞浆中, 可见细胞器减少, 出现电子半透明区, 接着绒毛和末端网状结构消失, 部分胞浆突入肠腔, 肠细胞变平、紧密连接消失, 脱落进入肠腔内. 在结肠内, 含毒的肠细胞出现一些CEF, 但未见细胞脱落.

本病依据临床、病理变化和流行病学很难做出诊断, 特别是与TEG不易区别, 必须依靠实验室技术才能作出确诊. 目前, 诊断方法有免疫电镜(IEM)、免疫荧光(IF)、间接血凝试验(IHA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、RT-PCR、中和试验等, 其中IF和ELISA是较常用的<sup>[15-17]</sup>.

王继科等<sup>[18]</sup>把PEDV的抗原和抗体分别经10 000 r/min离心、免疫复合物又经12 000 r/min离心后, 通过电镜观察到了典型的病毒粒子形成的免疫复合物, 并建立了具有3次筛选作用改良的IEM法. 朱维正等<sup>[19]</sup>以细胞培养的PED病毒致敏醛化鞣酸化红细胞, 对健康猪血清作间接血凝试验, 建立了IHA诊断PEDV的方法. 林志雄等<sup>[20]</sup>利用已适应于传代细胞生长的PED病毒PEDV-G1株, 以PK-15作指示细胞, 与被检血清进行微量中和, 测定待检血清中的特异性抗体, 48 h进行结果判定, 证实该方法可以用来检测PED病毒, 而且检测结果准确、可靠, 具有较高的敏感性, 可用于大规模的流行病学调查, 并建立了PED微量血清中和试验.

用直接免疫荧光法(fluorescent antibody technique, FAT)检测PEDV是最为敏感、快速、可靠的特异性诊断方法, 目前应用最为广泛, 但仅适用于急性腹泻期内患病仔猪切片的检查. 崔现兰等<sup>[21]</sup>应用FAT对PEDV人工感染仔猪的检出阳性率为91.4%(42/46), 应用间接FAT对PED阳性猪场血清的检出阳性率为89%. 林志雄等<sup>[22]</sup>用适应于Vero、PK-15等传代细胞株生长繁殖的PEDV-G1株建立了PEDV的FAT, 并与哈尔滨兽医研究所的荧光抗体方法检测结果相比较, 阳性符合率达95%, 阴性符合率90%, 且与TGE病毒、猪细小病毒、轮状病毒和大肠杆菌等没有交叉反应, 证明FAT法用于PED的诊断具有较高的准确性和特异性.

ELISA的最大的优点是可从粪便中直接检

查PEDV抗原, 目前应用也较为广泛. 此法最好在腹泻的急性期收集几个不同猪的粪便做检查. 对实验感染猪在感染后2-5 d检查, 可检出PED抗原. 朱维正等<sup>[23]</sup>用双抗体夹心法ELISA从腹泻病猪的粪便样本中直接检测PED病毒抗原, 其与电镜检查的阳性符合率为97.37%, 阴性符合率为100%.

近年来, 随着分子生物学的发展, 其诊断技术也发展迅速. 对于其病原的诊断, RT-PCR方法以其高度的敏感性和特异性在诊断中逐渐得到应用. 修金生等<sup>[24]</sup>参考GenBank上登录的PEDV的ORF3基因序列保守型片段设计特异性引物, 建立了检测PEDV的SYBR Green I 荧光定量RT-PCR方法, 结果表明, 建立的SYBR Green I 实时荧光定量RT-PCR方法为PEDV的早期感染的诊断及定量分析提供了新的方法. Ishikawa等<sup>[25]</sup>根据S基因序列设计了一对可扩增目的片段的引物, 成功地建立了诊断PEDV的RT-PCR方法, 可进行细胞毒和粪便毒的检测<sup>[25]</sup>. Jung等<sup>[26]</sup>使用了RT-PCR方法探测了PEDV的感染. Sozzi等<sup>[27]</sup>使用基于单克隆抗体的双抗体夹心法酶联免疫吸附试验(DAS-ELISA)和RT-PCR探测了PEDV, 并比较了两者在检测排泄物和肠道样品的相关性, 发现二者在检测排泄物时相关性较高.

## 4 免疫预防

疫苗免疫接种是目前预防PED的有效而可靠的方法. 该病由于发病日龄小、发病急、病死率高, 依靠自身的主动免疫往往来不及, 因此现行的PED疫苗大多是通过给母猪预防注射, 依靠初乳中的特异性抗体给仔猪提供良好的保护. 我国预防PED主要依赖于灭活疫苗和弱毒疫苗.

PED灭活疫苗安全性好, 母源抗体对免疫效果的影响小. 免疫妊娠母猪后, 产生的母源抗体对仔猪的保护性确实. 灭活疫苗可在母猪分娩前20-30 d肌肉或后海穴注射, 仔猪通过采食初乳而被动免疫获得保护. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所马思奇等在“八五”期间和“九五”期间分别完成了“TGE、PED二联灭活疫苗”的研制并应用于现地猪场. 哈药集团生物疫苗有限公司生产的TGE、PED二联灭活疫苗的主动免疫保护率为96%, 被动免疫保护率为85.1%, 可有效地预防PED的发生<sup>[28]</sup>.

Song等<sup>[29]</sup>将经Vero细胞致弱后的PEDV毒株通过口服途径免疫晚期妊娠母猪, 发病率明显降低, 且仔猪抗PEDV的SIgA含量明显升高.

研究表明, 细胞致弱的PEDV毒株可以用于口服疫苗, 诱导特异性的免疫, 从而有效预防PEDV感染. 李树根等<sup>[30]</sup>制备了PED和TGE弱毒二联疫苗, 用该弱毒二联疫苗免疫妊娠母猪, 对妊娠母猪安全, 其仔猪获得了良好的被动免疫, 用该二联弱毒疫苗免疫8-10日龄的哺乳仔猪证明安全, 并且免疫后能有效地保护妊娠母猪、初生仔猪、断奶猪和肥育猪抵抗TGEV和PEDV强毒的攻击. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所还研制出了PEDV、TGEV和RV三联活疫苗, 目前, 三联活疫苗在4个省的9个猪场先后进行了不同批次疫苗的临床试验(共计45 000头份). 临床试验各猪场反馈效果良好, 区域免疫保护率超过95%<sup>[31]</sup>.

虽然灭活疫苗具有安全、稳定的优点, 但同时具有免疫期短, 免疫剂量大等缺点. 且灭活苗只能通过注射免疫, 仔猪无法获得sIgA, 保护效果不佳. 而弱毒苗由于存在成本高、易返祖、有潜在感染危险等缺陷, 很难在实践中推广应用. 在病毒性腹泻的免疫机制中, 黏膜免疫具有非常重要的作用. 肠道黏膜分泌的IgA抗体能抵御入侵的病原体. 口服疫苗能刺激黏膜免疫, 并能产生黏膜和血清保护性IgA抗体, 是预防肠道传染病的有效途径<sup>[32]</sup>. Bae等<sup>[33]</sup>将PEDV的S基因转入烟草中, 构建了表达抗原的转基因烟草. 把这种携带抗原基因的转基因烟草饲喂动物, 试验结果表明这种转基因植物可诱导小鼠产生全身免疫和黏膜免疫. 焦茂兴等<sup>[34]</sup>构建了含有PEDV疫苗株sM、M、S基因的重组腺病毒, 将3个具有感染能力的复制缺陷性重组腺病毒共同感染Vero细胞, 细胞上清液进行小鼠免疫特性研究. 结果表明, 共同感染Vero细胞所得蛋白能诱导小鼠产生特异性体液免疫应答. PEDV重组腺病毒疫苗可经口接种, 使抗原物质对黏膜的免疫刺激作用更接近于病毒的自然感染途径, 有效地刺激黏膜免疫细胞产生分泌型IgA并引起全身性体液免疫应答. 葛俊伟等<sup>[35]</sup>将PEDV纤突蛋白S1基因片段插入干酪乳杆菌分泌型表达载体中, 构建了重组表达载体, 将其电转化干酪乳杆菌, 获得了表达分泌PEDV S1蛋白的重组乳酸菌杆菌. 将该重组干酪乳杆菌经口服接种途径免疫Balb/c小鼠, 结果表明该重组干酪乳杆菌表达系统能刺激动物黏膜免疫应答和系统免疫应答, 在肠道可产生分泌型IgA抗体, 并可检测到高水平血清IgG抗体. Suo等<sup>[36]</sup>(2012)构建了表达全长PEDV S基因和含有主要抗原位点

的S基因氨基酸端片段的DNA疫苗, 这些DNA疫苗可在真核细胞中表达, 同时在实验鼠体中诱导细胞和体液免疫应答, 特别是全长PEDV S基因有更好的免疫应答效果. 这些结果提示真核DNA质粒可作为一种预防PEDV的候选疫苗. 但PEDV抗原或PEDV抗原基因表达的蛋白经口接种时易被体内消化液、pH值、渗透强度、温度等生理因素破坏而失去抗原性. 如果利用高分子聚合物包裹如壳聚糖或壳聚糖季铵盐包裹PEDV重组腺病毒抗原或抗原蛋白, 制成生物降解微球或纳米粒, 使抗原颗粒化, 则可克服体内消化液、pH值、渗透强度、温度等生理因素对抗原的消化破坏作用<sup>[37]</sup>.

## 5 结论

近年来, PED的流行区域和流行强度有不断扩大的趋势, 对哺乳仔猪造成很高的致死率, 给养猪业造成了很大的经济损失. 我们相信随着对PEDV分子生物学技术的进一步完善和发展, 对PEDV结构的研究会越来越深入, 并能建立更为快捷而简便的分子生物学诊断方法, 并能研制出有效而经济的疫苗, 控制PED的发生.

## 6 参考文献

- 刘邓, 冉多良, 袁秀芳, 徐丽华, 牛登元, 张存, 王朝文, 王一成. 猪流行性腹泻病毒CH/ZJ分离株S基因的克隆、原核表达和免疫原性分析. 黑龙江畜牧兽医 2010; 3: 19-22
- 陈如敬, 吴学敏, 车勇良, 王隆柏, 魏宏, 庄向生, 严山, 周伦江. 猪流行性腹泻病毒FJ-11A株的分离与ORF3基因序列分析. 福建农业学报 2011; 26: 947-951
- 刘孝珍, 陈建飞, 时洪艳, 张鑫, 石达, 刘胜旺, 冯力. 2011年猪流行性腹泻病毒的遗传变异分析. 中国预防兽医学报 2012; 34: 180-183
- 徐国栋, 李峰, 张广峰. 国内猪流行性腹泻防治概况. 畜牧与兽医 2011; 43: 88-93
- 张世忠, 江斌. 2011年福建省猪流行性腹泻的流行特点及其防治措施. 福建畜牧兽医 2012; 34: 23-25
- 李龙. 仔猪流行性腹泻的最新流行情况. 养猪 2011; (5): 87-88
- 王凤, 汤德元, 李春燕, 王彬, 张晓杰, 甘振磊, 刘志杰. 猪流行性腹泻病毒基因及其疫苗的研究. 猪业科学 2010; 27: 42-47
- 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 北京: 科学出版社, 1997: 688-689
- 宣长和, 马春全, 陈志宝. 猪病学. 北京: 中国农业大学出版社, 2010: 213-217
- Barbara E. Straw, Jeffery J. Zimmerman, Sylvie D'Allaire, David J. Taylor. Diseases of swine. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006
- 甘孟侯, 杨汉春. 中国猪病学. 北京: 中国农业出版社, 2005: 188-190
- 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所. 动物传染病学. 北京: 中国农业出版社, 2008: 331-333
- 陈敷言. 兽医传染病学. 北京: 中国农业出版社, 2006: 229-231

## ■同行评价

本文就PED的病原学、发病机制、诊断和预防等方面的研究进展进行了较为系统的综述, 为相关研究提供了参考.

- 14 白文斌, 于康震. 动物传染病诊断学. 北京: 中国农业出版社, 2002: 395-401
- 15 李思银, 杨亮宇, 杨玉艾. 猪流行性腹泻的实验室诊断方法. 猪业科学 2010; 27: 54-57
- 16 李晓东. 猪流行性腹泻研究进展. 河北畜牧兽医 2005; 21: 29-30
- 17 Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 2012; 44: 167-175 [PMID: 22270324 DOI: 10.1007/s11262-012-0713-1]
- 18 王继科, 刘长明, 马思奇, 王明, 魏凤祥, 于文涛, 周金法. 猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻病毒的免疫电镜诊断的研究. 中国畜禽传染病 1991; (2): 22-25
- 19 朱维正, 郑瑞峰. 猪流行性腹泻血清学诊断法的研究. 中国畜禽传染病 1990; 11: 16-19
- 20 林志雄, 李树根, 李力复, 陈茹, 童昆周. 猪流行性腹泻微量血清中和试验的建立和应用. 中国兽医科技 1994; 24: 3-6
- 21 崔现兰, 马思奇, 王明, 于文涛, 魏凤祥, 周金法. 应用免疫荧光法诊断猪流行性腹泻的研究. 中国预防兽医学报 1990; (5): 20-26
- 22 林志雄, 黄引贤, 李树根, 李力复, 童昆周. 应用直接免疫荧光法检测猪流行性腹泻病毒的研究. 中国进出口动植物检验 1997; (2): 32-34
- 23 朱维正, 王新平, 常建兵. 应用ELISA(双抗体夹心法)检测猪流行性腹泻病猪粪便中的病毒抗原. 兽医大学学报 1988; (2): 14-18
- 24 修金生, 周伦江, 陈如敬, 王隆柏, 陈小权. 猪流行性腹泻病毒SYBR I 实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立. 中国兽医科学 2012; 42: 160-165
- 25 Ishikawa K, Sekiguchi H, Ogino T, Suzuki S. Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhoea virus by RT-PCR. *J Virol Methods* 1997; 69: 191-195 [PMID: 9504764 DOI: 10.1016/S0166-0934(97)00157-2]
- 26 Jung K, Kang BK, Lee CS, Song DS. Impact of porcine group A rotavirus co-infection on porcine epidemic diarrhoea virus pathogenicity in piglets. *Research in Veterinary Science* 2008; 84: 502-506 [PMID: 17727905 DOI: 10.1016/j.rvsc.2007.07.004]
- 27 Sozzi E, Luppi A, Lelli D, Martin AM, Canelli E, Brocchi E, Lavazza A, Cordioli P. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus. *Res Vet Sci* 2010; 88: 166-168 [PMID: 19501378 DOI: 10.1016/j.rvsc.2009.05.009]
- 28 张海丰, 李叔伟. 猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻二联灭活疫苗的生产应用. 用药指南 2011; (5): 62
- 29 Song DS, Oh JS, Kang BK, Yang JS, Moon HJ, Yoo HS, Jang YS, Park BK. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhoea virus DR13 strain. *Res Vet Sci* 2007; 82: 134-140 [PMID: 16730762 DOI: 10.1016/j.rvsc.2006.03.007]
- 30 李树根, 周仲芳, 李力复, 林志雄, 童昆周, 罗长保, 颜思通, 陈茹. 猪流行性腹泻和猪传染性胃肠炎弱毒二联疫苗研究. 中国兽医杂志 2000; 26: 5-8
- 31 郭春和, 黄毓茂, 项林盛, 唐丽云, 甘建平, 郭强, 焦茂兴. 猪流行性腹泻病毒结构蛋白及疫苗的研究进展. 畜牧与兽医 2011; 43: 83-87
- 32 陈建飞, 冯力, 时洪艳, 崔尚金. 猪流行性腹泻疫苗的研究. 猪业科学 2010; 27: 50-51
- 33 Bae JL, Lee JG, Kang TJ, Jang HS, Jang YS, Yang MS. Induction of antigen-specific systemic and mucosal immune responses by feeding animals transgenic plants expressing the antigen. *Vaccine* 2003; 21: 4052-4058 [PMID: 12922142 DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00360-8]
- 34 焦茂兴, 吴锋, 刘德辉, 黄毓茂. 猪流行性腹泻病毒重组腺病毒疫苗的构建及小鼠免疫试验. 中国畜牧兽医 2012; 39: 11-16
- 35 葛俊伟, 姜艳平, 汪淼, 乔新媛, 徐义刚, 唐丽杰, 李一经. 猪流行性腹泻病毒S1蛋白在干酪乳杆菌中的分泌表达及免疫原性分析. 中国预防兽医学报 2009; 31: 256-257
- 36 Suo S, Ren Y, Li G, Zarlenga D, Bu RE, Su D, Li X, Li P, Meng F, Wang C, Ren X. Immune responses induced by DNA vaccines bearing Spike gene of PEDV combined with porcine IL-18. *Virus Res* 2012; 167: 259-266 [PMID: 22643071 DOI: 10.1016/j.virusres.2012.05.007]
- 37 Zhao K, Shi X, Zhao Y, Wei H, Sun Q, Huang T, Zhang X, Wang Y. Preparation and immunological effectiveness of a swine influenza DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *Vaccine* 2011; 29: 8549-8556 [PMID: 21945253 DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.029]

编辑 李军亮 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.

# 猪流行性腹泻的诊断与预防

王靓靓, 李训良, 李鹏冲, 任晓峰

王靓靓, 李训良, 李鹏冲, 任晓峰, 东北农业大学动物医学学院预防兽医学系, 黑龙江省哈尔滨市 150030  
国家自然科学基金资助项目, No. 31201911; No. 31200122  
黑龙江省教育厅新世纪优秀人才基金资助项目, No. 1155-NCET-005  
黑龙江省高校科技创新团队基金资助项目, No. 2011TD001  
黑龙江省普通高等学校长江学者后备支持计划基金资助项目  
王靓靓, 硕士, 主要从事预防兽医学方面的研究。  
作者贡献分布: 此课题的设计与研究指导由任晓峰完成; 论文撰写由王靓靓, 李训良及李鹏冲完成; 审核和修改由任晓峰完成。  
通讯作者: 任晓峰, 教授, 博士生导师, 黑龙江省“龙江学者”奖励计划特聘教授, 150030, 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街59号, 东北农业大学动物医学学院预防兽医学系。 rxfemail@yahoo.com.cn  
电话: 0451-55190385  
收稿日期: 2012-09-17 修回日期: 2012-12-30  
接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-08

## Diagnosis and prevention of porcine epidemic diarrhea

Jing-Jing Wang, Xun-Liang Li, Peng-Chong Li, Xiao-Feng Ren

Jing-Jing Wang, Xun-Liang Li, Peng-Chong Li, Xiao-Feng Ren, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 31201911, 31200122; Program for New Century Excellent Talents in Heilongjiang Provincial University No. 1155-NCET-005; Research Team Program on Scientific and Technological Innovation in Heilongjiang Provincial University No. 2011TD001; and Sponsored by Chang Jiang Scholar Candidates Programme for Provincial Universities in Heilongjiang  
Correspondence to: Xiao-Feng Ren, Professor, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China. rxfemail@yahoo.com.cn; renxf@neau.edu.cn  
Received: 2012-09-17 Revised: 2012-12-30  
Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-08

### Abstract

Porcine epidemic diarrhea (PED) is a severe viral infectious disease caused by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), which often causes serious diarrhea, vomiting, dehydration, and high mortality in suckling piglets. This paper briefly summarizes the epidemiological and genetic characteristics, clinical symptoms, laboratory diagnosis and vaccine prevention of PED, with an aim to provide a reference for the prevention and control of this disease.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Porcine epidemic diarrhea; Porcine epidemic diarrhea virus

Wang JJ, Li XL, Li PC, Ren XF. Diagnosis and prevention of porcine epidemic diarrhea. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 33-38

### 摘要

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的一种严重的病毒性传染病。该病的特征是可以导致哺乳仔猪发生严重的腹泻、呕吐、脱水,并且致死率极高。本文在简述PEDV的流行病学、基因组特性和临床症状的基础上,对实验室诊断和疫苗防治等方面进行综述,为猪流行性腹泻病的防控提供参考。

© 2013版权归Baishideng所有。

**关键词:** 猪流行性腹泻; 猪流行性腹泻病毒

王靓靓, 李训良, 李鹏冲, 任晓峰. 猪流行性腹泻的诊断与预防. *世界华人消化杂志* 2013; 21(1): 33-38  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/33.asp>

### 0 引言

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)在1971年在英国首次被报道,之后在日本、德国、比利时等地爆发。在1976年,中国首次报道了该病。在之后的20年间,该病已经在我国的20多个省份爆发,给农民及养猪业造成了巨大的损失。在欧洲,猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的腹泻主要集中在架子猪、育肥猪及青年种猪。在我国,各年龄的猪都极易感染PEDV的猪群<sup>[1]</sup>。在寒冷季节,猪的病理性腹泻主要由猪流行性腹泻病毒引起,保育与育肥猪的群的感染率高于哺乳仔猪和母猪<sup>[2]</sup>。

### 1 基因型

PEDV基因组是单股正链RNA,与其他的冠

### ■背景资料

本文在简述猪流行性腹泻病毒(PEDV)的流行病学、基因组特性和临床症状的基础上,主要对实验室诊断和疫苗防治等方面进行综述,为猪流行性腹泻病的防控提供参考。

### ■同行评议者

王俊平, 教授, 山西省人民医院消化科



### ■ 研发前沿

随着猪流行性腹泻在我国的发生,越来越多的研究者开始重视这种猪腹泻病。本文主要从诊断和免疫预防等方面进行综述,为预防该病提供了更多的理论依据。

病毒具有相似性。PEDV基因组5'端有一个帽子结构(cap), 3'端有一个Poly(A)尾。现在已经测定了PEDV CV777株完整的基因组序列,大小为28 033 bp<sup>[3]</sup>。目前除了人冠状病毒229E毒株(HCoV-229E)外,已知的其他冠状病毒成员都有Kozak序列,但是序列有所差异<sup>[4]</sup>。基因组序列包括6个ORF,从5'→3'依次为编码复制酶多聚蛋白lab、纤突蛋白、ORF3蛋白、小膜蛋白、膜糖蛋白和核衣壳蛋白的基因。在我国有不同于CV777疫苗株的新基因型的PEDV在流行,而他是否是CV777疫苗株的变异株,还需要进一步的实验验证<sup>[5]</sup>。

## 2 临床症状

猪流行性腹泻的临床症状一般表现为严重的水样腹泻,并伴有呕吐现象,全身脱水明显,粪便稀且呈黄色或灰黄色。病猪精神萎靡,眼窝下陷,食欲减退或废绝,病猪在腹泻3-4 d后,会因严重脱水而死亡。PED的临床症状与猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis of swine, TGE)较为相似。两者相比,PED的传播速度较慢,持续时间相对较长,腹泻程度也相对较轻<sup>[6]</sup>。

## 3 实验室诊断

PED在临床症状上与TGE极其相似,而通过临床症状很难鉴别出这两种病,有时还会与猪轮状病毒共同感染。所以,通常用实验室诊断技术来检验是否是PEDV引起的腹泻。常用的实验室诊断技术有微量血清中和试验、免疫电镜法(immuno electron microscopy, IEM)、免疫荧光法(fluorescent antibody technique, FAT)、酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)等。

**3.1 微量血清中和试验** 1994年,林志雄等<sup>[7]</sup>建立了PED微量中和试验,该方法用已适应于传代细胞生长的猪流行性腹泻病毒PEDV-G1株,用PK-15作指示细胞,与被检血清进行微量中和,测定待检血清中的特异性抗体,判定时间为48 h。该方法检测结果准确、可靠,具有较高的敏感性,可用于大规模的流行病学调查。

**3.2 免疫电镜法** 1991年,王继科等<sup>[8]</sup>把抗原和抗体分别经10 000×g离心,对抗原-抗体复合物又经12 000×g离心,最后在电镜下直接观察到典型的病毒粒子形成的免疫复合物,建立了具有三次筛选作用的改进直接IEM法,该方法具有简

便、直观、快速和定性正确等优点,可作为鉴别诊断PEDV和TGEV的手段之一。1999年,王继科等<sup>[9]</sup>运用EM和IEM法对PEDV和TGEV进行了观察,EM结果表明两者在形态上存在有细微差异:PEDV为多形性,粒子大小变化范围较大,纤突短小而密集,核芯呈多形性;TGEV为圆形,或椭圆形,粒子大小较均一,纤突大而稀疏,核芯为环形。IEM结果PEDV与TGEV无免疫交叉反应。可应用EM和IEM对PEDV和TGEV做实验室诊断。

**3.3 免疫荧光** 1990年,崔现兰等<sup>[10]</sup>用直接FAT对PEDV人工感染仔猪的检出阳性率为91.4%,电镜观察阳性率为67.4%,可以得出免疫荧光比电镜观察更为可靠的结论;用间接免疫荧光法(IFAT)的检出率为89%,并用IFAT检查PED阳性的广东等省农场52头份血清进行TGE中和试验,首次证明在我国也存在PED和TGE的混合感染。1997年,林志雄等<sup>[11]</sup>用适应于Vero、PK-15等传代细胞株生长繁殖的PEDV-G1株建立直接FAT。同时,应用哈尔滨兽研所的荧光抗体方法比较。证明该方法具有较高的准确性和特异性。但该方法的检测样本均为病死猪的肠黏膜深层压片,所以该方法不能用于发病初期的检测,在临床诊断中具有一定的局限性。

**3.4 酶联免疫吸附试验** ELISA可以直接从腹泻的猪体粪便中检测出病毒,当病猪出现了腹泻症状时,可立即检测,做到早诊断,早治疗。此法应用广泛,较为可靠。1995年,孙智锋等<sup>[12]</sup>应用纯化PEDV抗原和酶标葡萄球菌A蛋白(PPA)建立了PPA-ELISA,选定的PEDV包被浓度为1:20,样品稀释度为1:80,通过对免疫猪血清PEDV抗体的动态测定及临床自然感染猪血清抗体水平的检测表明,该法敏感、特异、简便、快速,尤适于基层猪场大批血清样品抗体水平的普查与检测。1997年,陈茹等<sup>[13]</sup>用分离纯化的PEDV抗原,建立了用于检测PEDV抗体的斑点酶联免疫吸附试验(Dot-ELISA),并对比了该方法和琼脂扩散试验的检测情况,结果表明, Dot-ELISA更敏感,且该法重复性较好。2000年,邹勇等<sup>[14]</sup>用PEDV细胞培养物中提纯的抗原和组织毒免疫获得的高免血清建立了间接ELISA检测PEDV抗体水平。选定的包被抗原浓度为1:20 000,酶标羊抗猪IgG浓度选用1:250为测定抗PEDV IgG抗体的最适工作浓度。田间检测结果与临床发病和预期结果一致。2002年,邹勇等<sup>[15]</sup>建立的PED、TGE和RV的ELISA抗体检测方法完全可以达到实验所需的要求,应用田间试验检测未用疫苗

免疫的猪场, PEDV抗体的阳性率几乎达100%, 部分猪场PEDV和TGEV呈混合感染. 而RV抗体水平阳性率普遍很高, 这说明轮状病毒的感染成为我国的常见疾病. 2005年, Rodák等<sup>[16]</sup>通过制备PEDV单克隆抗体膜蛋白M和检测PEDV, 来比较3种阻断ELISA. 结果显示CB-ELISA具有高灵敏度和高特异性. 检查38个猪群获得的80个猪粪腹泻样本, 在6个(16%)猪群的15(19%)个腹泻样本中检测出PEDV的存在. 2011年, 张利勃等<sup>[17]</sup>参考已知的胶体金免疫层析法(gold immunochromatography assay, GICA)工作原理基础之上, 将葡萄球菌蛋白A(staphylococcal protein A, SPA)进胶体金标记作为指示介质, 将基因工程表达PEDV M蛋白抗原和自制的抗SPA多抗血清包被硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NCM)分别作为检测线和质控线, 由此制成一种检测PEDV血清抗体的快速诊断试纸. 其特异性、敏感性试验与ELISA进行比较. 结果表明该GICA与参考检测方法 ELISA具有相近的灵敏度, 其符合率达96%. 说明该GICA检测技术的建立为检测PEDV抗体提供了一种快速简便的方法. 2011年, Ren等<sup>[18]</sup>利用抗PEDV-M抗体建立了一种检测PEDV的间接ELISA. 该方法使用纯化重组的M蛋白免疫家兔产生该抗体, 并用IFA分析表明抗PEDV-M抗体与PEDV感染细胞发生反应. 该方法具有高特异性与敏感性, 为利用ELISA检测PEDV提供了重要参考.

**3.5 反转录-聚合酶链式反应** 随着分子生物学的不断发展, 关于PEDV的检测方法越来越受到广大研究学者的重视. RT-PCR技术也成为了检测PEDV的最有效的技术手段之一. 国内外的研究人员已经在这方面进行了深入研究.

2003年, 吴凌等<sup>[19]</sup>利用RT-PCR扩增出854 bp的PEDV M基因的全长片段, 以其为模板, 通过巢式反转录PCR(RT-nested PCR)扩增到412 bp的M基因的部分片段. 2010年, Ben Salem等<sup>[20]</sup>建立了检测猪肠道病毒的多重巢式PCR, 可以检测到PEDV的RNA浓度为27.2 μg/μL, 证明了巢式PCR的敏感快速. 2010年, 刘邓等<sup>[21]</sup>设计了一对特异性引物和探针, 扩增长度为186 bp的片段. 以克隆N基因的质粒作为阳性标准品, 建立了一种快速检测猪流行腹泻病毒含量的TaqMan荧光定量RT-PCR方法.

由于PED属于病毒性腹泻病, 而病毒性腹泻病是由猪流行性腹泻、传染性胃肠炎和猪轮状病毒引起的, 所以通过临床症状很难区分这3种

病毒. 多重RT-PCR就很好地解决了这个问题.

2009年, 田小艳等<sup>[22]</sup>针对猪轮状病毒的VP6基因309 bp、TGEV的N基因612 bp和PEDV的N基因492 bp设计并合成了扩增引物, 建立了多重RT-PCR的检测方法. 2010年, 张坤等<sup>[23]</sup>也建立了能同时检测PEDV(M基因663 bp)、TGEV(N基因528 bp)和猪A轮状病毒(VP7基因333 bp)的多重RT-PCR的检测方法. 2011年, 郑新添等<sup>[24]</sup>建立了多重RT-PCR检测方法, 该方法针对猪轮状病毒的VP7基因412 bp、TGEV的M基因252 bp和PEDV的N基因540 bp.

**3.6 RT-LAMP技术** RT-LAMP技术是基于RT的环介导等温扩增, 该技术可在等温条件下进行链置换核酸扩增. RT-LAMP的检测是在LAMP扩增DNA的基础上, 加入了反转录酶而实现扩增检测RNA, 反转录和扩增一步完成, 省去了传统RT-PCR要先进行的反转录步骤. 2011年, Ren等<sup>[25]</sup>建立了一种RT-LAMP, 该方法一方面能从临床病料中检测PEDV或TGEV, 又能对TGEV、PRV、PRRSV及猪的伪狂犬病毒等进行鉴别诊断, 同时具有比RT-PCR技术及ELISA更高的敏感性. 同时Li等<sup>[26]</sup>也建立了能对TGEV进行鉴别诊断的高敏感RT-LAMP, 为有效检测猪病毒性腹泻提供了重要参考.

## 4 防治

### 4.1 免疫接种

**4.1.1 灭活疫苗:** 1993年, 王明等<sup>[27]</sup>用PEDV毒株研制氢氧化铝灭活疫苗. 接种途径为后海穴位. 以0.1 mL/头主动免疫接种3日龄仔猪, 保护率为77.28%; 以0.5 mL/头主动免疫接种3-22日龄仔猪, 保护率为85%; 以3 mL/头被动免疫接种妊娠母猪, 其所产3日龄仔猪的保护率为97.06%. 接种疫苗后14 d开始产生免疫力. 免疫期可达6 mo. 疫苗在室温保存226 d仍保持较好的免疫原性.

**4.1.2 弱毒疫苗:** 有研究表明<sup>[6]</sup>, PED的发病率和死亡率的高低与母猪是否进行疫苗免疫有关. 1999年, Kweon等<sup>[28]</sup>利用分离到的野毒株KPEDV-9适应Vero细胞, 并连续传代至93代, 同时进行了主动免疫、被动免疫试验和安全性试验, 证实了KPEDV-9可作为弱毒苗使用.

**4.1.3 转基因植物疫苗:** 2005年, Kang等<sup>[29]</sup>在无尼古丁的烟草中表达合成了PEDV(K-COE)中和表位基因, 外源抗原的表达量占全部可溶性植物蛋白的2.1%, 大约是天然的5倍, 为可食性转基因植物疫苗的研究奠定了基础.

### ■ 相关报道

Suo和Ren等的研究指出pIL-18基因作为PEDV S抗原基因分子佐剂具有免疫增强的作用. 为进一步研究pIL-18生物活性提供了数据, 同时为新型免疫增强型抗PEDV疫苗研究提供了理论基础. 此类疫苗制备简单, 可同时组合其他免疫佐剂, 因此也是一种值得期待和深入研究的疫苗.

### ■创新盘点

以往的文献大部分只是单一的讲述PED的流行特点或是某一种的诊断方法等。本文引用近十年的文献,在总结PED的流行病学和临床症状的同时,也将该病的诊断方法和预防措施做了一个系统的总结,能让读者更加了解到近些年国内外学者研究PED的动向。

4.1.4 乳酸杆菌疫苗: 2009年,胡桂学等<sup>[30]</sup>将已经构建完成的含有PEDV纤突蛋白COE基因的重组菌pNZ8149-COE-NZ3900大量培养后,用1 ng/mL乳链菌肽诱导,分别口服免疫断奶仔猪和妊娠母猪,用MTT法和间接ELISA法检测淋巴细胞转化情况和仔猪血清IgG、肠黏膜和妊娠母猪初乳中PEDV SIgA抗体水平。结果表明,口服重组乳酸杆菌仔猪与对照组的淋巴细胞增殖试验刺激指数差异显著、血清中IgG和SIgA均较对照组明显增加,口服重组乳酸杆菌妊娠母猪乳汁中SIgA较对照组显著升高。由于乳酸杆菌本身具有一定的免疫调节作用,因此此类疫苗在安全性和功效性方面有一定优势。

4.1.5 亚单位疫苗: 2012年,焦茂兴等<sup>[31]</sup>通过RT-PCR和重组PCR技术扩增出PEDV疫苗株sM、M、S基因,构建重组腺病毒穿梭质粒。穿梭质粒与BJ5183细菌同源重组构建同源重组腺病毒质粒,同源重组腺病毒质粒经Pac I酶切后转染AD-293细胞,获得3个含有目的基因的重组腺病毒。将3个具有感染能力的复制缺陷性重组腺病毒共同感染Vero细胞,细胞上清液进行小鼠免疫特性研究。结果表明,共同感染Vero细胞所得蛋白能诱导小鼠产生特异性体液免疫应答。

4.1.6 二联疫苗: PEDV和TGEV同属冠状病毒,在临床上的表现也相似,因此,研究制备二联疫苗是可行的。二联疫苗主要适用于妊娠母猪的被动免疫和不同日龄猪的主动免疫。1999年,佟有恩等<sup>[32]</sup>用PED和TGE克隆化弱毒株以1:1配成PED、TGE二联弱毒疫苗,毒价为 $10^{7.0-7.5}$ TCID<sub>50</sub>/0.3 mL,主动免疫和被动免疫的保护率为97.7%和98.0%。弱毒株毒力稳定,复合制苗标准。免疫7 mo,疫苗保存期一年。疫苗接种猪对同圈饲养的非免疫猪有低效价(16-32倍)的水平感染。6个猪场的田间试验保护率为95%-98%,对紧急预防接种的防治效果更明显。2000年,李树根等<sup>[33]</sup>用PED弱毒疫苗株PEDV-G1P83和TGE弱毒疫苗株TGEV-AG1制成PED和TGE弱毒二联疫苗,并进行了保存期试验、安全效力、免疫期试验和区域试验。结果表明,试验疫苗在-20℃保存4 mo,经4 mo保存的疫苗免疫效力未见下降。4℃保存48 h对疫苗病毒的毒价没有明显影响。用该弱毒二联疫苗能够安全地对妊娠母猪和哺乳仔猪进行免疫,免疫后能有效地保护初生仔猪、断奶猪和肥育猪抵抗TGEV和PEDV强毒的攻击。该弱毒二联疫苗在区域试验中能显著降低猪病毒性腹泻的发病

率和死亡率,取得良好的效果。2002年,还红华等<sup>[34]</sup>进行了PED和TGE二联油乳剂灭活疫苗的研究,并进行了免疫试验,结果表明被动免疫保护率高达98.9%,较主动免疫效果更为明显,因此,在实际生产中可以采取以被动免疫的方式为主的预防措施。2011年,孟凡丹等<sup>[35]</sup>构建了同时编码TGEV S1和PEDV S1(pIRES-T1-PI)以及TGEV S1和PEDV S(pIRES-T1-P2)两个二联核酸疫苗。用脂质体法转染到BHK-21细胞中,利用间接免疫荧光试验(IFA)检测出两个重组质粒编码的三种蛋白均能在真核表达系统中表达。利用6-8周龄的昆明鼠进行免疫特性研究。结果表明:二联核酸疫苗明显增加了T淋巴细胞的增殖能力和CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的数量,并能够诱导机体产生较高水平的干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)。免疫后42 d pIRES-T1-P2组能够产生明显的特异性CTL活性。在免疫后35 d均能够刺激机体产生较高的抗体水平,并诱导机体产生特异性中和抗体。2012年,Suo等<sup>[36]</sup>利用淋巴细胞增殖试验、ELISA等方法,检测了T淋巴细胞增殖功能,外周血中抗PEDV特异性抗体水平以及IFN-γ、白介素4(interleukin-4, IL-4)的表达量等免疫指标,成功研制出pVAX1-PEDV S1和pVAX1-pIL-18联合疫苗,同时证明了pIL-18基因作为PEDV S抗原基因分子佐剂具有免疫增强的作用。为进一步研究pIL-18生物活性提供了数据,同时为新型免疫增强型抗PEDV疫苗研究提供了理论基础。此类疫苗制备简单,可同时组合其他免疫佐剂,因此也是一种值得期待和深入研究的疫苗。

4.1.7 三联疫苗: 2000年,牛小迎等<sup>[37]</sup>研制的黄芪佐剂的猪病毒性腹泻三联疫苗,置干燥阴凉处可保存1年,疫苗有效保护期4 mo,实验室免疫仔猪183头,主动免疫保护率92.7%,被动免疫保护率89%。田间免疫仔猪2 744头,免疫保护率90%。主动免疫与被动免疫在统计学上无显著性差异,生产中可根据实际情况选用不同免疫方法。2005年,邹勇等<sup>[38]</sup>制备了PEDV、TGEV和RV的三联灭活疫苗。实验室免疫结果表明,妊娠母猪和育肥猪免疫后15 d达到较高的免疫水平,免疫有效期超过6 mo,妊娠母猪所产仔猪可获得高水平的被动免疫保护。试验场应用结果表明,母猪保护率达98%,仔猪被动免疫保护率达93%。

4.2 药物治疗 2004年,陈无瑕等<sup>[39]</sup>利用中药方剂石乌散进行治疗,临床效果显著。对PED进行进一步研究,人工复制出病例,又用“石乌散”进

行治疗, 效果令人满意. 实践证明, “石乌散”对猪流行性腹泻的治愈率达98.9%, 预防效果达100%. 2009年, Pyo等<sup>[40]</sup>开发了一种用scFv来防止PEDV感染的预防性药物. 在大肠杆菌表达系统中, 表达了用来验证抗PEDV的鼠单克隆抗体中的scFv. 在病毒中和试验中证实PEDV中和纯化重组scFv活性后, scFv在大肠杆菌细胞表面表达. 大肠杆菌表达scFv中和PEDV形成了 $5 \times 10^6$  CFU, 和野生型大肠杆菌相比病灶减少了94%. 这个结果表明大肠杆菌在细胞表面表达的scFv保留了母源抗体的功效从而阻止PEDV在体外感染靶细胞. 这个体外分析结果提出了重组大肠杆菌细胞表达scFv作为一种新型的抗PEDV感染的预防药的思路.

4.3 综合防治 加强猪舍的饲养管理, 做好清洁卫生和消毒, 保持猪舍的干爽, 及时清理粪便. 由于PED大多在寒冷季节发病, 所以在冬季要特别注意提高饲养管理, 加强饲料中的能量供应, 提高猪的抵抗能力, 猪舍要保证恒温, 加强光照. 在发生猪流行性腹泻疾病后, 猪的抵抗力会下降, 从而可能会继发其他疾病, 使病情变得严重, 所以猪群发生腹泻等症时, 应当提高警惕, 做好鉴别诊断工作, 并做好隔离预防. 猪场要定期对猪进行检查, 定期预防接种, 接种的最佳时期是每年的8-9 mo, 猪场应及时采购疫苗实施集中免疫<sup>[41]</sup>.

### 5 结论

近年来, PEDV的研究已经取得了一定的进展, 特别是在PEDV的实验室诊断和疫苗研制方面, 通过实验室诊断方法, 及时发现PEDV的感染, 做到早发现, 早治疗, 并通过疫苗的预防接种, 可以大大减少PEDV对猪业市场的危害. 由于国内混合感染情况常有发生, 因此在三联疫苗的研究上还应进一步深入. 相信在不久的将来能够对猪腹泻行疾病该病将有更深入的了解, 并为预防此类疾病提供更坚实的基础.

### 6 参考文献

- 1 甘振磊, 汤德元, 李春燕, 王彬, 张晓杰, 王凤, 刘志杰. 猪流行性腹泻流行特点及流行现状的研究. *猪业科学* 2010; 27: 24-28
- 2 张坤. 猪病毒性腹泻多重RT-PCR诊断方法的建立和应用及猪轮状病的分离. 华中农业大学, 2010
- 3 Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, Tobler K. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* 2001; 23: 137-144 [PMID: 11724265 DOI: 10.1023/A:1011831902219]
- 4 Brian DA, Baric RS. Coronavirus genome structure and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; 287:

- 1-30 [PMID: 15609507 DOI: 10.1007/3-540-26765-4\_1]
- 5 陈建飞, 王承宝, 时洪艳, 陈小金, 张志榜, 冯力. 猪流行性腹泻病毒的分子流行病学研究. *中国畜牧兽医学* 会畜牧兽医学生物技术学分会暨中国免疫学会兽医免疫分会第八次学术研讨会论文集 2010: 203-206
- 6 林志武. 猪流行性腹泻的流行特点及其防治措施. *福建畜牧兽医* 2011; 33: 14-15
- 7 林志雄, 李树根, 李力复, 陈茹, 童昆周. 猪流行性腹泻微量血清中和试验的建立和应用. *中国兽医科技* 1994; 24: 3-6
- 8 王继科, 刘长明, 马思奇, 王明, 魏凤祥, 于文涛, 周金法. 猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻病毒的免疫电镜诊断的研究. *中国畜禽传染病* 1991; (2): 22-25
- 9 王继科, 马思奇, 王明, 刘长明, 魏凤祥, 于文涛, 周金法. 猪流行性腹泻与猪传染性胃肠炎病毒的电镜和免疫电镜观察. *中国预防兽医学报* 1999; 21: 191-194
- 10 崔现兰, 马思奇, 王明等, 于文涛, 魏凤祥, 周金法. 应用免疫荧光法诊断猪流行性腹泻的研究. *中国畜禽传染病* 1990; (5): 19-24
- 11 林志雄, 黄引贤, 李树根, 李力复, 童昆周. 应用直接免疫荧光法检测猪流行性腹泻病毒的研究. *中国进出口动植物检* 1997; (2): 32-34
- 12 孙智锋, 钱永清, 唐永兰, 许大新. 猪流行性腹泻抗体PPA-ELISA检测方法的建立及其应用. *上海畜牧兽医通讯* 1995; (5): 28-29
- 13 陈茹, 罗琼, 李树根, 黄侠芳. 间接法Dot-ELISA检测猪流行性腹泻抗体的研究. *中国兽医杂志* 1997; 23: 10-13
- 14 邹勇, 唐永兰, 苏万国, 许大新, 陈培龙, 钱永清. 间接ELISA检测猪流行性腹泻病毒的抗体水平. *上海畜牧兽医通讯* 2000; (1): 18-19
- 15 邹勇, 唐永兰, 苏万国, 何锡忠. ELISA鉴别检测猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和轮状病毒抗体水平的研究. *上海畜牧兽医通讯* 2002; (6): 12-13
- 16 Rodák L, Valíček L, Smíd B, Nevoránková Z. An ELISA optimized for porcine epidemic diarrhoea virus detection in faeces. *Vet Microbiol* 2005; 105: 9-17 [PMID: 15607079 DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.09.020]
- 17 张利勃, 周铁忠, 王坤, 高慎阳. 猪流行性腹泻胶体金抗体检测技术的建立及其应用. *中国农学通报* 2011; 27: 374-377
- 18 Ren X, Suo S, Jang YS. Development of a porcine epidemic diarrhoea virus M protein-based ELISA for virus detection. *Biotechnol Lett* 2011; 33: 215-220 [PMID: 20882317 DOI: 10.1007/s10529-010-0420-8]
- 19 吴凌, 李一经, 田志军, 刘贵元. 应用RT-nested PCR检测猪流行性腹泻病毒的研究. *中国兽医科技* 2003; 33: 27-29
- 20 Ben Salem AN, Chupin Sergei A, Bjadovskaya Olga P, Andreeva Olga G, Mahjoub A, Prokhvatilova Larissa B. Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. *J Virol Methods* 2010; 165: 283-293 [PMID: 20170679 DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.02.010]
- 21 刘邓, 袁秀芳, 冉多良, 徐丽华, 牛登元, 王朝文, 王一成. TaqMan荧光定量PCR检测猪流行性腹泻病毒方法的建立与初步应用. *中国动物传染病学报* 2010; 18: 28-33
- 22 田小艳, 孙华, 邓雨修, 苏润环, 王东东, 宋延华. 3种致猪腹泻病毒的多重RT-PCR检测. *动物医学进展* 2009; 30: 54-57
- 23 张坤, 何启盖. 猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒和猪A群轮状病毒多重RT-PCR检测方法的建立及临床应用. *畜牧兽医学报* 2010; 41: 1001-1005
- 24 郑新添, 杨小燕, 戴爱玲, 李晓华, 陈星星. 猪传染性胃肠炎病毒、猪流行性腹泻病毒和猪轮状病毒三重PCR检测方法的建立. *龙岩学院学报* 2011; 29: 55-58
- 25 Ren X, Li P. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid

■同行评价  
本文从诊断与防控两个方面进行总结为实际生产应用提供参考.



- detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Genes* 2011; 42: 229-235 [PMID: 21286798 DOI: 10.1007/s11262-011-0570-3]
- 26 Li P, Ren X. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of transmissible gastroenteritis virus. *Curr Microbiol* 2011; 62: 1074-1080 [PMID: 21127872 DOI: 10.1007/s00284-010-9825-9]
- 27 王明, 马思奇, 周金法, 于文涛, 魏凤祥, 崔现兰, 冯力, 佟有恩, 黄绍棠, 刘长明. 猪流行性腹泻灭活疫苗的研究. *中国畜禽传染病* 1993; 5: 17-19
- 28 Kweon CH, Kwon BJ, Lee JG, Kwon GO, Kang YB. Derivation of attenuated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) as vaccine candidate. *Vaccine* 1999; 17: 2546-2553 [PMID: 10418901 DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00059-6]
- 29 Kang TJ, Seo JE, Kim DH, Kim TG, Jang YS, Yang MS. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants. *Protein Expr Purif* 2005; 41: 378-383 [PMID: 15866725 DOI: 10.1016/j.pep.2005.02.018]
- 30 胡桂学, 刁鹏祥, 陈中秋, 牛伟. PEDV COE基因重组乳酸菌仔猪和妊娠母猪免疫研究. 第十三次学术研讨会会议论文集 2009: 815-818
- 31 焦茂兴, 吴锋, 刘德辉, 黄毓茂. 猪流行性腹泻病毒重组腺病毒疫苗的构建及小鼠免疫试验. *中国畜牧兽医* 2012; 39: 11-15
- 32 佟有恩, 冯力, 李伟杰, 朱远茂, 王明, 马思奇. 猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻二联弱毒疫苗的研究. *中国预防兽医学报* 1999; 21: 406-410
- 33 李树根, 周仲芳, 李力复, 林志雄, 童昆周, 罗长保, 颜思通, 陈茹. 猪流行性腹泻和猪传染性胃肠炎弱毒二联疫苗研究. *中国兽医杂志* 2000; 26: 5-8
- 34 还红华, 何孔旺, 倪艳秀, 林继煌, 华国浩, 梁晓辉. 猪流行性腹泻与猪传染性胃肠炎二联油乳剂灭活疫苗的田间免疫试验. *中国兽医杂志* 2002; 38: 29-30
- 35 孟凡丹. 猪传染性胃肠炎和流行性腹泻二联核酸疫苗免疫效力研究. 东北农业大学, 2011
- 36 Suo S, Ren Y, Li G, Zarlenga D, Bu RE, Su D, Li X, Li P, Meng F, Wang C, Ren X. Immune responses induced by DNA vaccines bearing Spike gene of PEDV combined with porcine IL-18. *Virus Res* 2012; 167: 259-266 [PMID: 22643071 DOI: 10.1016/j.virusres.2012.05.007]
- 37 牛小迎, 叶成玉, 张君, 任晓凤, 韩国华. 猪病毒性腹泻三联疫苗的免疫研究. *青海畜牧兽医杂志* 2000; 30: 7-8
- 38 邹勇, 许宝华, 钱永清, 唐永兰, 苏万国, 何锡忠, 周芝萍. 猪流行性腹泻、猪传染性胃肠炎和猪轮状病毒三联苗免疫试验. *江西农业大学学报* 2005; 27: 107-109
- 39 陈无瑕, 马雪云, 侯宗良, 徐毅, 张仰民. 中草药制剂防治猪流行性腹泻病研究. 国家科技成果 2004
- 40 Pyo HM, Kim IJ, Kim SH, Kim HS, Cho SD, Cho IS, Hyun BH. Escherichia coli expressing single-chain Fv on the cell surface as a potential prophylactic of porcine epidemic diarrhea virus. *Vaccine* 2009; 27: 2030-2036 [PMID: 19428826 DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.130]
- 41 洪云华. 猪流行性腹泻流行规律及防治对策. *安徽农学通报* 2011; 17: 140-141

编辑 李军亮 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

## • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内30个省、市、自治区、特别行政区的483位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医医学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。

# 猪传染性胃肠炎病毒致病机制的研究进展

殷相平, 任晓峰, 柳纪省

殷相平, 柳纪省, 中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部草食动物疫病重点开放实验室 甘肃省兰州市 730046

任晓峰, 东北农业大学兽医学院预防兽医学系 黑龙江省哈尔滨市 150030

殷相平, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事预防兽医学的研究。

家畜疫病病原生物学国家重点实验室开放基金课题, No. SK LVEB2012KFKT007

作者贡献分布: 本文主要由殷相平撰写; 任晓峰负责修改与校对; 柳纪省设计文章框架和文章思路。

通讯作者: 柳纪省, 研究员, 博士生导师, 730046, 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部草食动物疫病重点开放实验室。

liujixing@hotmail.com

电话: 0931-8342682 传真: 0931-8340977

收稿日期: 2012-09-17 修回日期: 2012-12-30

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-08

## Progress in understanding pathogenic mechanisms of porcine transmissible gastroenteritis virus

Xiang-Ping Yin, Xiao-Feng Ren, Ji-Xing Liu

Xiang-Ping Yin, Ji-Xing Liu, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences; Key Laboratory of Grazing Animal Diseases of Ministry of Agriculture, Lanzhou 730046, Gansu Province, China

Xiao-Feng Ren, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China

Supported by: Open Funding of State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, No. SKLVEB2012KFKT007

Correspondence to: Ji-Xing Liu, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences; Key Laboratory of Grazing Animal Diseases of Ministry of Agriculture, Lanzhou 730046, Gansu Province, China. liujixing@hotmail.com

Received: 2012-09-17 Revised: 2012-12-30

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-08

## Abstract

Porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) is an animal coronavirus that causes severe gastroenteritis in young TGEV-seronegative pigs. This review will focus on recent advances in research of the genomic structure, major structural proteins and their function, virus propagation and replication, virus receptors, genetics and pathogenic mechanisms of TGEV.

These data will be helpful in understanding the molecular biological characteristics and genetic variation of TGEV and have important theoretical significance for the development of new vaccines and antiviral drugs.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Porcine transmissible gastroenteritis; Pathogenic mechanisms

Yin XP, Ren XF, Liu JX. Progress in understanding pathogenic mechanisms of porcine transmissible gastroenteritis virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 39-43

## 摘要

猪传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)是引起仔猪严重腹泻的一种动物冠状病毒。本文就TGEV的基因组结构、主要结构蛋白及功能、病毒繁殖与复制、病毒受体、病毒变异以及病毒致病机制等方面的国内外研究进展和现状进行综述。这些资料有助于理解TGEV的分子生物学特性、遗传与变异规律,对新型疫苗的研发及抗病毒药物的筛选具有重要的理论价值。

© 2013版权归Baishideng所有。

关键词: 猪传染性胃肠炎病毒; 致病机制

殷相平, 任晓峰, 柳纪省. 猪传染性胃肠炎病毒致病机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21(1): 39-43

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/39.asp>

## 0 引言

猪传染性胃肠炎(porcine transmissible gastroenteritis, TGE)是由猪传染性胃肠炎病毒(porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)感染引起的仔猪严重腹泻、呕吐和脱水为主要特征的高度接触性传染病。该病最早于1946年在美国报道,我国从20世纪60年代就有该病的报道,目前该病已在世界多个国家发生,给养猪业造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。本文就近年来TGEV基因组结构、主要结构蛋白及功能、病毒繁殖与复

## ■背景资料

猪传染性胃肠炎(TGE)是由猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)感染引起的以仔猪严重腹泻、呕吐和脱水为主要特征的高度接触性传染病。该病最早于1946年在美国报道,我国从20世纪60年代就有该病的报道,目前该病已在世界多个国家发生,给养猪业造成严重的经济损失。

## ■同行评议者

吴军, 研究员, 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所

## ■ 研发前沿

冠状病毒是感染人类和动物的一类重要病原, TGEV等动物冠状病毒的感染和流行对我国养猪业的持续健康发展构成了巨大威胁。

制、病毒受体、病毒变异以及病毒致病机制等方面的研究进展综述如下。

### 1 病毒基因组结构

TGEV属于不分节段的单股正链RNA病毒,其基因全长约为28.5 kb,是已知RNA病毒中基因组最大的病毒。其基因组的5'端有甲基化的帽子结构,3'端有PolyA尾,直接有mRNA的功能,病毒RNA具有感染性。TGEV基因组由7个开放阅读框(ORF1-ORF7)组成,ORF1位于基因组5'端,长约20 kb,几乎占整个基因组的2/3,编码病毒的复制-转录酶。余下的3'端长约8.3 kb,约占基因组的1/3,主要编码病毒的结构蛋白和非结构蛋白,其编码顺序是5'-S-3a-3b-E-M-N-7-3'。除了基因3有两个ORF(ORF3a和ORF3b)外,其余的基因都只有一个ORF。在病毒复制过程中TGEV能产生7-8个亚基因组mRNA,每个mRNA都含有3'同末端的套式结构。第2个、第4个、第5个和第6个亚基因组mRNA分别编码纤突(S)蛋白、小膜(E)蛋白、膜(M)蛋白和核衣壳(N)蛋白<sup>[2]</sup>。而ORF3a和ORF3b和7分别编码非结构蛋白。TGEV各个基因之间被重复的转录调整序列隔开,这些调整序列都有一个保守的核心序列(core sequence, CS)5'-CUAAAC-3'。调整序列对于基因的转录有一定的影响,是引导序列-聚合酶复合体转录亚基因组mRNA的起始信号。基因组中最大的非编码区位于3'端N端上游不含PolyA尾延伸区的280个核苷酸,这一现象类似于分节段的RNA病毒<sup>[3]</sup>。

### 2 病毒主要结构蛋白及功能

S蛋白,又称为E2蛋白,是一种纤突蛋白,位于病毒的最外面,由1 447-1 449个氨基酸残基编码,分子量约200 kDa。S蛋白氨基端是TGEV识别靶细胞、诱导产生中和抗体和决定病毒组织嗜性的密切相关区。其中219残基区与病毒粒子对肠道的组织嗜性至关重要。不同毒株氨基端变异较大。S蛋白的4个主要抗原位点(A、B、C、D)也存在于氨基端区域。A位点主要诱导中和抗体的产生,可分成Aa、Ab、Ac 3个亚位点,核心分别存在于538、591和543等3个残基处,A位点在S蛋白中保守<sup>[4]</sup>。B存在于97-144残基区,C位点存在于49-52残基区,D位点存在于382-385残基区,B、C、D 3位点均不保守。A、B两位点是依赖于S蛋白的糖基化作用和正确折叠构型产生的,而C、D两位点的这种依赖性则很小<sup>[5]</sup>。S蛋白羧基端构成纤突的柄及跨膜区,高度保守。在

TGEV S蛋白的N端区域存在一血凝活性区,用唾液酸酶处理TGEV可激发血凝活性,但此区域在TGEV的呼吸道变异株猪呼吸道冠状病毒(porcine despiratory corouavi rus, PRCV)的S蛋白中缺失,因此检测血凝活性的存在与否是一种区分PRCV和TGEV的方法<sup>[6]</sup>。

M蛋白,又称为E1蛋白,是基质蛋白,约为262个氨基酸,分子量28-31 kDa。S蛋白与M蛋白相联形成病毒外膜,M蛋白的羧基端暴露在病毒粒子的表面,是病毒的免疫显性区,针对此区域的抗体可以中和TGEV和介导TGEV感染的细胞发生补体溶解反应。M蛋白氨基端6-22残基区存在一干扰素基因决定簇,可在体内外诱导 $\alpha$ -干扰素的产生<sup>[7]</sup>。

N蛋白,又称核蛋白,位于病毒粒子内部,由382个氨基酸组成,分子量47 kDa。N蛋白是一种磷酸化蛋白,与病毒基因组的RNA相结合,呈螺旋式结构。N蛋白有2个主要抗原位点,分别位于其N端和C端。N蛋白含有蛋白水解位点,通过蛋白水解作用和去磷酸化作用,对病毒粒子的装配起重要影响<sup>[8]</sup>。

sM蛋白,又称膜结合蛋白,是一种较小的膜结合蛋白,分子质量约为7.9 kDa,根据其核酸序列推断,sM蛋白由78个氨基酸组成,每个病毒粒子中含有的拷贝数仅20-30个,其结构和功能尚待进一步深入研究。

### 3 病毒的复制与繁殖

TGEV的繁殖周期起始于病毒粒子外膜的S蛋白与敏感细胞的受体相结合,通过内吞作用和细胞融合进入细胞进行复制。病毒的复制完全在细胞浆内进行,当TGEV颗粒进入细胞后,病毒基因组RNA的5'端(ORF1)首先翻译出早期依赖于RNA的RNA多聚酶,他使病毒基因组转录成全长的互补链,此负链RNA通过两个不同的晚期RNA多聚酶转录成正链RNA和一套约6个亚基因组mRNAs。这些亚基因组mRNAs的5'端均有帽子结构,3'端都有多聚腺嘌呤尾,即所谓3'同末端套式结构。在5'端都含有同一先导序列,长度约72个核苷酸。先导RNA先独立合成,然后从负链RNA模板上解离出来,再重新结合于不同mRNA起始位点处的模板上,作为转录的引物。在每个基因之间有一个内部重复序列UCU-AAAC他与转录酶和细胞因子相互作用而“剪切”先导序列成为每个ORF起始点。当结构蛋白和基因组RNA复制完成后,在宿主细胞的内

质网中装配出新的病毒颗粒, 并通过高尔基体分泌至细胞外. 其中TGEV的S蛋白在转译的同时被糖基化, 而M蛋白是在进入高尔基体内后被糖基化的, 这两种糖蛋白均插入病毒的囊膜中, S蛋白位于囊膜内的部分与核衣壳相连接, 囊膜外的部分可插入宿主细胞膜, 起病毒颗粒吸附宿主细胞的作用<sup>[9,10]</sup>.

#### 4 病毒受体

TGEV的细胞受体是猪氨基肽酶(pAPN), 病毒与pAPN受体结合位点位于TGEV病毒S蛋白的522-744氨基酸之间<sup>[11]</sup>. Ren等<sup>[12]</sup>通过表达不同pAPN片段, 通过ELISA和免疫荧光以及病毒感染抑制实验证明pAPN的3个主要区域36aa-223aa、349aa-591aa和592-963aa是3个主要的与抗pAPN抗体结合的区域, 同时这些位点也能有效阻断TGEV感染细胞的能力. 推测pAPN的主要抗体结合区可能与其与TGEV结合区域相关. 实验证明原核表达的pAPN制备的多克隆抗体能有效阻断TGEV与pAPN的结合, 并可用于通过免疫组织化学的方法定位pAPN在小肠中的定位<sup>[13]</sup>. 这些证据强调了pAPN作为TGEV的一种细胞受体在TGEV感染中扮演重要角色. 冠状病毒有几个成员如牛冠状病毒等能与唾液酸相互作用, 与细胞表面的唾液酸酶(也就是所谓的神经氨酸酶)结合是病毒起始感染的基本条件. 唾液酸是决定TGEV血凝素活性的主要受体, 在培养的细胞中感染TGEV可以不需要唾液酸, 缺失了唾液酸结合活性的TGEV突变株可以利用pAPN受体在培养细胞中生长良好, 但是突变株病毒与亲本病毒在吸附细胞表面方面具有显著性差异. 用神经氨酸酶预处理细胞再感染病毒可导致病毒与细胞表面结合能力下降6倍, 检测发现, 用神经氨酸酶处理细胞表面蛋白后, 使结合膜相关唾液酸蛋白被破坏. 虽然TGEV感染体外培养的细胞不依赖其唾液酸活性作为感染的基本条件, 但是TGEV感染胃肠道的组织嗜性必须要和唾液酸活性结合, 病毒与唾液酸的相互作用可能有助于病毒通过覆盖在小肠上皮细胞的唾液酸比较丰富的黏液层. TGEV S蛋白序列的改变可降低病毒的致病性或使其失去毒性. 即, 若TGEV的S蛋白结构改变后失去了结合唾液酸的能力, 则TGEV就不再感染大量分泌有唾液酸的胃肠组织. TGEV具有特异性的血凝素活性, 能被特异性抗血清所抑制, 研究表明S蛋白上存在唾液酸的血凝素<sup>[14,15]</sup>. 另外, 在病毒感染

方面, Ren等<sup>[16]</sup>研究发现, 胆固醇对TGEV感染细胞具有重要意义, 试验表明, 用甲基-环糊精处理细胞后, 细胞膜上的胆固醇缺失, 可显著地降低TGEV感染效率. 另外在病毒外膜缺失胆固醇同样也会降低病毒的感染性. 这是一个很有趣的发现, 因为冠状病毒在胆固醇含量低的高尔基前体出芽, 因此必须在有外源胆固醇的条件下病毒才可以恢复感染性, 这表明TGEV成功感染需要在病毒外膜和细胞膜上有胆固醇. 另外, Ren等<sup>[17]</sup>利用噬菌体展示技术鉴定了几个能与pAPN特异性结合多肽分子, 这些多肽能竞争性抑制TGEV与pAPN结合, 该研究结果为抗TGEV感染提供了新思路.

#### 5 病毒感染的免疫

先天性免疫反应是机体抵抗病毒感染的第一道屏障, 病毒为了生存已经演化出不同的策略逃避这种反应. 研究表明冠状病毒的几个非结构蛋白在逃避先天性免疫反应方面具有重要作用. 通过反向遗传操作技术缺失基因7的TGEV毒株, 与亲本病毒进行比较发现, 缺失基因7的TGEV毒株在感染细胞时由于增加细胞RNA的降解和eIF2a的磷酸化, 因此能增强细胞凋亡, 并导致蛋白翻译关闭. 蛋白7有一段保守的序列可介导与磷酸化蛋白催化亚基结合, 是已经鉴定的关键的细胞抗病毒反应的调节蛋白. 用重组的缺失基因7的毒株和野生型毒株感染新生仔猪, 发现缺失基因7的病毒生长速度和病理变化比野生型毒株快, 结果表明基因7能抵抗宿主细胞抗病毒反应<sup>[18]</sup>.

猪传染性胃肠炎病毒特异性中和抗体的产生依赖于病毒结构蛋白之间的合作配合, Antón等<sup>[19]</sup>用亲和层析纯化的S蛋白、M蛋白和N蛋白免疫仔猪表明, 将S蛋白和N蛋白联合免疫或将S蛋白和M蛋白联合免疫均能获得高滴度的中和抗体, 而将M蛋白和N蛋白联合免疫产生的中和性抗体较低, 但是将3种蛋白单独免疫不能产生中和性抗体. 该研究结果表明, 在诱导高滴度TGEV特异性抗体时必须要有两种蛋白的联合刺激, 目前S蛋白和N蛋白联合免疫产生的中和抗体水平最高.

#### 6 病毒变异

PRCV是TGEV的变异株, 主要感染呼吸道组织, 首次分离于比利时的猪呼吸道组织, 感染该病毒的猪能产生TGEV的抗体<sup>[20]</sup>. 序列比较显示该

#### ■ 相关报道

Krempl等通过突变S蛋白与血凝素活性相关的一个氨基酸或在S蛋白的145到155氨基酸残基处缺失4个氨基酸均可导致病毒毒力的显著降低, 甚至失去血凝素活性, 这表明TGEV的唾液酸结合活性对病毒感染具有重要作用.



### ■同行评价

本文全面阐述了TGEV在分子生物学方面取得的研究进展,对新型疫苗的研发具有一定的借鉴意义。

病毒与TGEV的同源性达96%,两种病毒的主要区别是呼吸道冠状病毒存在3个基因的缺失.在PRCV的S基因的5'端有大的片段缺失,主要位于621-681核苷酸之间,不同的毒株缺失的位置不同,由于缺失可能导致S基因1-2个抗原位点的丢失,根据这些丢失的抗原位点可以通过阻断ELISA区分仔猪感染的是TGEV或PRCV<sup>[21]</sup>.欧洲株和美洲株的PRCV在S基因和ORF3a基因的缺失位置上略有不同,欧洲株PRCV缺失S基因的672个核苷酸(224个氨基酸),美洲株PRCV缺失S基因的681个核苷酸(227个氨基酸).在基因3a和3b有较小的缺失,对PRCV降低在肠道的复制能力起重要作用.许多TGEV的突变起源于病毒的点突变或重组.S基因145-155氨基酸的点突变可能导致唾液酸结合活性是丧失,从而影响病毒的组织嗜性和病毒的毒力.研究表明TGEV S蛋白N端氨基酸的改变对病毒感染胃肠道的嗜性非常重要.TGEV和PRCV均利用pAPN受体感染宿主细胞,与TGEV病毒比较,PRCV缺失正好是S蛋白具有的血凝素活性唾液酸结合位点,因此PRCV不能在肠道有效复制<sup>[22]</sup>.由于欧洲PRCV的流行,相当于TGEV天然的弱毒疫苗,因此被感染的动物产生大量可抵抗TGEV的抗体,使欧洲TGEV的流行趋于下降趋势,目前我国尚未报道PRCV的流行.

### 7 病毒致病机制

猪传染性胃肠炎病毒是一个典型的感染胃肠道的冠状病毒,但也可以在呼吸道组织中复制.该病毒能耐受胃液中低pH环境,感染覆盖在空肠和回肠绒毛上的柱状上皮细胞.当上皮细胞感染后,导致细胞脱落以及绒毛萎缩和随后的腹泻.TGEV引起胃肠炎的程度取决于被感染动物的年龄.尽管所有年龄的猪均可易感该病,但在仔猪最为严重.2周龄的仔猪感染TGEV后20 h出现呕吐,然后出现连续数天的腹泻,经常导致脱水甚至死亡.年龄较大的动物通常从胃肠炎中恢复过来,但病后出现生长迟缓.不同组织器官对TGEV的易感性取决于感染动物的年龄、环境、病毒剂量和病毒的毒力等几个因素.病毒对胃肠道的致病性取决于S蛋白,S蛋白序列的改变可降低病毒的致病性或使病毒失去毒性.TGEV的唾液酸结合活性位于S蛋白,而PRCV则缺少这段S基因,因此没有唾液酸结合活性.TGEV用神经氨酸酶处理以后血凝素活性显著提升,同时用神经氨酸酶处理正常的细胞,然

后感染TGEV这样也可以提升其血凝素活性.Krempl等通过突变S蛋白与血凝素活性相关的一个氨基酸或在S蛋白的145到155氨基酸残基处缺失4个氨基酸均可导致病毒毒力的显著降低,甚至失去血凝素活性,这表明TGEV的唾液酸结合活性对病毒感染具有重要作用<sup>[23,24]</sup>.

### 8 结论

冠状病毒是感染人类和动物的一类重要病原,TGEV等动物冠状病毒的感染和流行对我国养猪业的持续健康发展构成巨大威胁.目前,动物冠状病毒及其与宿主天然免疫反应的关系还不十分清楚,人类和动物冠状病毒种类较多,病毒复制周期及其影响因素比较复杂,病毒编码结构蛋白和非结构蛋白的功能及其相互作用比较复杂,这就可能决定了动物冠状病毒与宿主抗病毒天然免疫反应及其机制的复杂性.因此对TGEV复制与繁殖、病毒受体、感染与免疫、病毒变异以及致病机制等方面的研究,有助于理解冠状病毒的分子生物学特性、遗传与变异规律,对新型疫苗的研发及抗病毒药物的筛选有重要的理论价值.

### 9 参考文献

- 1 殷震,刘景华.动物病毒学.第2版.北京:科学出版社,1997:681-688
- 2 Penzes Z, Gonzalez JM, Calvo E, Izeta A, Smerdou C, Méndez A, Sanchez CM, Sola I, Almazan F, Enjuanes L. Complete genome sequence of transmissible gastroenteritis coronavirus PUR46-MAD clone and evolution of the purdue virus cluster. *Virus Genes* 2001; 23: 105-118 [PMID: 11556396 DOI: 10.1023/A:1011147832586]
- 3 Alonso S, Izeta A, Sola I, Enjuanes L. Transcription regulatory sequences and mRNA expression levels in the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* 2002; 76: 1293-1308 [PMID: 11773405 DOI: 10.1128/JVI.76.3.1293-1308.2002]
- 4 Gebauer F, Posthumus WP, Correa I, Suñé C, Smerdou C, Sánchez CM, Lenstra JA, Meloen RH, Enjuanes L. Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis coronavirus S glycoprotein. *Virology* 1991; 183: 225-238 [PMID: 1711257 DOI: 10.1016/0042-6822(91)90135-X]
- 5 Delmas B, Rasschaert D, Godet M, Gelfi J, Laude H. Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike glycoprotein S. *J Gen Virol* 1990; 71: 1313-1323 [PMID: 1693663 DOI: 10.1099/0022-1317-71-6-1313]
- 6 Schwegmann-Wessels C, Herrler G. Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconj J* 2006; 23: 51-58 [PMID: 16575522 DOI: 10.1007/s10719-006-5437-9]
- 7 Escors D, Izeta A, Capiscol C, Enjuanes L. Transmissible gastroenteritis coronavirus packaging

- signal is located at the 5' end of the virus genome. *J Virol* 2003; 77: 7890-7902 [PMID: 12829829 DOI: 10.1128/JVI.77.14.7890-7902.2003]
- 8 Risco C, Muntión M, Enjuanes L, Carrascosa JL. Two types of virus-related particles are found during transmissible gastroenteritis virus morphogenesis. *J Virol* 1998; 72: 4022-4031 [PMID: 9557690]
  - 9 Tooze J, Tooze S, Warren G. Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur J Cell Biol* 1984; 33: 281-293 [PMID: 6325194]
  - 10 Wesley RD, Cheung AK, Michael DD, Woods RD. Nucleotide sequence of coronavirus TGEV genomic RNA: evidence for 3 mRNA species between the peplomer and matrix protein genes. *Virus Res* 1989; 13: 87-100 [PMID: 2549745 DOI: 10.1016/0168-1702(89)90008-7]
  - 11 Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjöström H, Norén O, Laude H. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 1992; 357: 417-420 [PMID: 1350661 DOI: 10.1038/357417a0]
  - 12 Ren X, Li G, Liu B. Binding characterization of determinants in porcine aminopeptidase N, the cellular receptor for transmissible gastroenteritis virus. *J Biotechnol* 2010; 150: 202-206 [PMID: 20643168 DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.07.019]
  - 13 Liu B, Li G, Sui X, Yin J, Wang H, Ren X. Expression and functional analysis of porcine aminopeptidase N produced in prokaryotic expression system. *J Biotechnol* 2009; 141: 91-96 [PMID: 19428736 DOI: 10.1016/j.jbiotec.2009.02.005]
  - 14 Herrler G, Rott R, Klenk HD, Müller HP, Shukla AK, Schauer R. The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminidase-O-acetyltransferase. *EMBO J* 1985; 4: 1503-1506 [PMID: 2411539]
  - 15 Schwegmann-Wessels C, Zimmer G, Laude H, Enjuanes L, Herrler G. Binding of transmissible gastroenteritis coronavirus to cell surface sialoglycoproteins. *J Virol* 2002; 76: 6037-6043 [PMID: 12021336 DOI: 10.1128/JVI.76.12.6037-6043.2002]
  - 16 Ren X, Glende J, Yin J, Schwegmann-Wessels C, Herrler G. Importance of cholesterol for infection of cells by transmissible gastroenteritis virus. *Virus Res* 2008; 137: 220-224 [PMID: 18727942 DOI: 10.1016/j.virusres.2008.07.023]
  - 17 Ren X, Liu B, Yin J, Zhang H, Li G. Phage displayed peptides recognizing porcine aminopeptidase N inhibit transmissible gastroenteritis coronavirus infection in vitro. *Virology* 2011; 410: 299-306 [PMID: 21176936 DOI: 10.1016/j.virol.2010.11.014]
  - 18 Cruz JL, Sola I, Becares M, Alberca B, Plana J, Enjuanes L, Zuñiga S. Coronavirus gene 7 counteracts host defenses and modulates virus virulence. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002090 [PMID: 21695242 DOI: 10.1371/journal.ppat.1002090]
  - 19 Antón IM, González S, Bullido MJ, Corsín M, Risco C, Langeveld JP, Enjuanes L. Cooperation between transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) structural proteins in the in vitro induction of virus-specific antibodies. *Virus Res* 1996; 46: 111-124 [PMID: 9029784 DOI: 10.1016/S0168-1702(96)01390-1]
  - 20 Pensaert M, Callebaut P, Vergote J. Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. *Vet Q* 1986; 8: 257-261 [PMID: 3018993 DOI: 10.1080/01652176.1986.9694050]
  - 21 Laude H, Van Reeth K, Pensaert M. Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Vet Res* 1993; 24: 125-150 [PMID: 8393722]
  - 22 Vaughn EM, Halbur PG, Paul PS. Sequence comparison of porcine respiratory coronavirus isolates reveals heterogeneity in the S, 3, and 3-1 genes. *J Virol* 1995; 69: 3176-3184 [PMID: 7707547]
  - 23 Bernard S, Laude H. Site-specific alteration of transmissible gastroenteritis virus spike protein results in markedly reduced pathogenicity. *J Gen Virol* 1995; 76: 2235-2241 [PMID: 7561760 DOI: 10.1099/0022-1317-76-9-2235]
  - 24 Krempf C, Schultze B, Laude H, Herrler G. Point mutations in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Virol* 1997; 71: 3285-3287 [PMID: 9060696]

编辑 李军亮 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费

本刊讯 为了方便作者来稿, 保证稿件尽快公平、公正的处理, 《世界华人消化杂志》编辑部研究决定, 从2011年开始对所有来稿不再收取审稿费。审稿周期及发表周期不变。(编辑部主任: 李军亮 2011-01-01)

# 猪流行性腹泻病毒蛋白结构与功能的初探

茅翔, 任晓峰

## ■背景资料

猪流行性腹泻病毒是导致猪流行性腹泻的主要病原体, 猪流行性腹泻在我国依然较为常见, 对养猪业的健康发展造成很大的威胁。因此有必要继续大力加强对该病毒的研究。进一步了解猪流行性腹泻病毒各个蛋白的生物学功能, 对寻找有效的药物或生物干预制剂, 有着重要意义。

茅翔, 南京农业大学动物医学院 江苏省南京市 210095  
任晓峰, 东北农业大学动物医学学院预防兽医系 黑龙江省哈尔滨市 150030  
茅翔, 教授, 博士生导师, 主要从事流行性乙型脑炎, 猪繁殖与呼吸综合征病毒及猪流行性腹泻病毒与宿主细胞相互作用的研究。国家自然科学基金资助项目, No. 31270188  
作者贡献分布: 本综述由茅翔完成; 任晓峰负责审校。  
通讯作者: 茅翔, 教授, 210095, 江苏省南京市卫岗1号, 南京农业大学动物医学院. xmao@njau.edu.cn  
收稿日期: 2012-09-17 修回日期: 2012-12-30  
接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-08

## Functions of proteins of porcine epidemic diarrhea virus

Xiang Mao, Xiao-Feng Ren

Xiang Mao, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China  
Xiao-Feng Ren, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China  
Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 31270188  
Correspondence to: Xiang Mao, Professor, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, 1 Weigang, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China. xmao@njau.edu.cn  
Received: 2012-09-17 Revised: 2012-12-30  
Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-08

## Abstract

Porcine epidemic diarrhea (PED) is caused by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), which belongs to the order Nidovirales of the family Coronaviridae. Since PED was first discovered in Europe in 1987, it has become a severe infectious disease in Asian countries (including China, Korea, Japan, Philippines and Thailand) and has caused great economic losses in swine industry. Although bivalent vaccine for PEDV and transmissible gastroenteritis virus (TGEV, another porcine coronavirus) can decrease the incidence of both diseases, the incidence of PED is still increasing annually in China. Unfortunately, there have been few studies on viral proteins and pathogenesis of PEDV. This review aims to provide some functional insights on PEDV viral proteins based on the available information from coronaviruse studies.

## ■同行评议者

陈敬贤, 教授, 安徽医科大学微生物学教研室

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Porcine epidemic diarrhea virus; Non-structural protein; Structural protein

Mao X, Ren XF. Functions of proteins of porcine epidemic diarrhea virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 44-53

## 摘要

猪流行性腹泻是猪流行性腹泻病毒引起的猪肠道传染性疾病。该病毒属于尼多病毒目, 冠状病毒属。虽然猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)首次在欧洲发生, 但是目前已经成为包括中国、韩国、日本、菲律宾以及泰国等亚洲国家猪产业中严重的传染性疾病, 造成了严重的经济损失。目前猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)和猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)二联灭活苗及弱毒苗的应用大大降低了两种病毒病的发生率, 但是我国目前PED的流行仍呈逐年上升趋势。目前对PEDV的致病机制了解较少, 本综述旨在借助其他冠状病毒病毒蛋白结构和功能的研究成果, 对PEDV编码的病毒蛋白进行初步分析, 以期为深入研究PEDV提供一些新的思路。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; 非结构蛋白; 结构蛋白

茅翔, 任晓峰. 猪流行性腹泻病毒蛋白结构与功能的初探. *世界华人消化杂志* 2013; 21(1): 44-53  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/44.asp>

## 0 引言

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的猪肠道传染性疾病。目前其在临床上与猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)和猪轮状病毒(porcine rotavirus, PRV)腹泻共存混合感染, 给该病的防控

和研究带来极大的不利. 猪流行性腹泻仅发生在猪上, 各种年龄的猪都能感染. 本病多发于寒冷季节. 春秋季节也有小规模流行发生. 哺乳仔猪、架子猪和育肥猪的发病率高达100%, 尤以对哺乳仔猪的危害最为严重. 成年母猪发病率为70%-90%. 虽然PED首次在欧洲发生, 但是目前已经成为包括中国、韩国、日本、菲律宾以及泰国等亚洲国家猪产业中严重的传染性疾病, 造成了巨大的经济损失. TGEV和PEDV二联灭活苗及弱毒苗的应用虽然大大降低了两种病毒病的发生率, 但是我国目前猪流行性腹泻的发病率仍呈逐年上升趋势. 爆发该病时无特效抗病毒药物可以使用.

PEDV基因组为单股正链RNA, 具有感染性. 全长为27 000-33 000个核苷酸. 属于I类冠状病毒. 目前已经测定了PEDV-CV777、PEDV-CH/S、PEDV-CH/FJND-3/2011和PEDV-DR13及其弱毒株的全基因组序列<sup>[1-4]</sup>. PEDV基因组包括5'和3'非翻译区, 3'有多聚腺嘌呤核苷酸序列. 基因组编码4个结构蛋白(S蛋白、囊膜蛋白E、膜蛋白M和核衣壳蛋白N)以及15个非结构蛋白1-15(nonstructural protein, nsp)和ORF3. 排列顺序为5'-nsp1-15-S-ORF3-E-M-N-3'. 在15个非结构蛋白中nsp11-nsp15分别编码5个与病毒基因组复制有关的酶. 这些酶与一些病毒非结构蛋白和宿主蛋白相互作用形成复制复合体负责病毒基因组复制.

目前对于PEDV的研究多数还是集中在流行性病学调查、不同毒株M蛋白、S蛋白以及N蛋白序列变化以及进化分析、PEDV的检测方法和PEDV入胞机制等的研究. 而对于PEDV的致病机制, 病毒编码的结构和非结构蛋白的结构功能的研究目前报道很少. 这对于研究防控PEDV的方法极其不利. PEDV与同类的TGEV、人冠状病毒NL63(human coronavirus NL63, HCoV-NL63)和人冠状病毒299E(human coronavirus 299E, HCoV-299E)等病毒的序列同源性较高, 与其他类冠状病毒在部分病毒蛋白序列上也有一定同源性. 对于这些病毒的致病机制和病毒蛋白的结构功能已有一些研究报道. 本综述旨在综合分析已有的一些冠状病毒研究进展, 为进一步研究PEDV的致病机制等提供一些思路.

## 1 非结构蛋白

### 1.1 nsp1 目前没有关于PEDV编码的非结构蛋白1(non-structural protein 1, nsp1)的生物学功能研

究的报道. PEDV编码的nsp1长度为110个氨基酸, 与同类的I型冠状病毒的nsp1的长度大致相同, 在氨基酸序列上与蝙蝠冠状病毒(bat coronavirus, BtCoV)、HCoV-NL63和HCoV-229E的同源性较高. 严重急性呼吸道综合征病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)的nsp1的NMR结构已有报道. 在其13-128位区域内与I类冠状病毒nsp1在用于维持蛋白结构的重要疏水氨基酸上保守性较强. 因此推测这两类病毒nsp1在结构上可能较接近<sup>[5]</sup>.

SARS-CoV的nsp1可以抑制宿主基因表达, 主要是通过结合在宿主40S核糖体上来阻止宿主蛋白的翻译, 并诱导宿主mRNA的降解. 病毒基因组的5'-末端引导序列可以保护病毒mRNA免受nsp1介导的RNA降解<sup>[6]</sup>.

TGEV的nsp1在功能上与SARS-CoV的nsp1类似, 可以有效地抑制宿主蛋白的合成. 与SARS-CoV的nsp1的作用机制不同的是TGEV的nsp1并不结合到40S核糖体或促进宿主蛋白mRNA降解. 他可以抑制HeLa细胞提取物中的蛋白翻译, 但是并不能抑制兔网状细胞裂解物中的蛋白翻译. 因此推测某些宿主蛋白可能参与TGEV的nsp1对宿主蛋白翻译的抑制过程<sup>[7]</sup>.

研究还表明属于I类冠状病毒的HCoV-NL63和HCoV-229E的nsp1可以结合到宿主细胞核糖体40S亚基上, 且不抑制IRF-3的激活. 宿主蛋白的转录和翻译都受nsp1的抑制, 而对翻译的抑制更强烈. HCoV-NL63和HCoV-229E均属于低致病性冠状病毒. 但是他们的nsp1抑制宿主蛋白翻译的效果要比SARS-CoV的nsp1的作用更强烈, 推测这些nsp1更可能作为病毒的毒力因子促进病毒的增殖, 而不是主要的致病因子<sup>[5]</sup>. TGEV的感染可以激活宿主的先天免疫并诱导I型干扰素的产生<sup>[8,9]</sup>, 而SARS-CoV和小鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus, MHV)只能诱导微弱和迟缓的先天免疫反应<sup>[10-12]</sup>. HCoV-229E的nsp1可以稳定地刺激干扰素转录因子的激活, 被感染细胞可以产生大量的IFN- $\beta$ <sup>[5]</sup>. 由于PEDV、TGEV、HCoV-NL63和HCoV-229E同属I类冠状病毒, 因此PEDV的nsp1对于宿主细胞先天免疫反应和宿主蛋白翻译等的影响是否与这些病毒类似还有待进一步研究.

### 1.2 nsp2 PEDV的nsp2编码785个氨基酸. 氨基酸序列与同类冠状病毒的同源性较高, 包括BtCoV和猫冠状病毒(feline coronavirus, FCoV)等. 而其他类冠状病毒同源性较差, 大小和序列变化

## ■ 相关报道

目前对于PEDV发病机制和病毒编码蛋白的功能的研究仍然欠缺.

### ■创新盘点

本文通过对近年来冠状病毒的一些研究结果进行综述,全面地归纳了猪流行性腹泻病毒各个蛋白可能的结构特点和功能,对PEDV的研究具有很好的参考价值。

较大.与PEDV同类的冠状病毒的nsp2的功能目前没有报道.SARS-CoV的nsp2与包括nsp8在内的7个病毒蛋白有相互作用,其自身也会形成二聚或多聚物<sup>[13]</sup>.MHV和SARS-CoV的nsp2并不是病毒在细胞上生长所必需,缺失nsp2会造成病毒生长和RNA合成减弱,但病毒蛋白的翻译不受影响,因此nsp2可能在病毒总体RNA合成上具有重要作用,同时还可能在病毒和宿主细胞相互作用或病毒致病机制中起作用<sup>[14]</sup>.外源表达的nsp2并不像在感染病毒时那样定位于特定的膜结构上,但是感染缺失nsp2的MHV后反式表达nsp2,nsp2仍会募集至复制复合体上.虽然nsp2并不是形成复制复合体所必需的蛋白,但是在复制过程中,nsp2仍会与复制复合体中的nsp4、nsp8和dsRNA共定位<sup>[15]</sup>.

SARS-CoV病毒的nsp2和宿主细胞的PHB1和PHB2相互作用.这两个蛋白是进化上较为保守的蛋白.他们与细胞周期进程、细胞迁移、分化和凋亡等有关.因此nsp2可能在病毒感染过程中起到调节宿主细胞生理环境的作用<sup>[16]</sup>.

由于PEDV的nsp2与SARS-CoV和MHV的nsp2序列差别较大,其nsp2的功能是否与这两个病毒的nsp2有相似之处还有待进一步研究.通过酵母双杂交以及其他研究蛋白质间相互作用的方法寻找与nsp2相互作用的宿主蛋白对进一步研究nsp2生物学功能具有重要意义.

**1.3 nsp3** nsp3是PEDV编码的最长的病毒蛋白(1 621个氨基酸).SARS-CoV的nsp3预测有3个疏水结构域,实验证明有一个疏水结构域不在脂双层中<sup>[17]</sup>.nsp3上还有一些在其他冠状病毒中都存在的结构域.其中一个ADP-核糖-1'-单磷酸酶(ADP-ribose-1'-monophosphatase,ADRP)结构域,负责催化ADP-核糖-1'-单磷酸为ADP-核糖.目前只在少数病毒中发现该结构域的存在,包括风疹病毒、甲病毒、戊肝病毒等.目前SARS-CoV、HCoV-N163、HCoV-229E和FCoV的ADRP结构域的结构已有报道<sup>[18-21]</sup>.TGEV的ADRP的活性也有报道<sup>[22]</sup>.SARS病毒的反向遗传的研究表明ADRP酶活中心的突变对于病毒复制没有很明显的影 响.缺失该结构域的SARS-CoV和HCoV-229E与野生型病毒相比对IFN- $\alpha$ 的敏感性增加,因此ADRP可能与病毒的免疫逃逸机制有关<sup>[23]</sup>.

PEDV的nsp3上还包含两个木瓜酶样蛋白酶结构域(papain-like protease,PLP).可能主要负责nsp1/nsp2和nsp2/nsp3之间的裂解.该结构域

与TGEV和SARS-CoV病毒的nsp3上木瓜酶样蛋白酶的同源性为30%左右.TGEV的PLP1结构已经得到解析<sup>[24]</sup>.结构整体上与SARS-CoV的PLP2类似,结构上有一个锌结合区.对HCoV-229E的PLP1的研究表明锌结合区域是水解nsp1/nsp2所必需<sup>[25,26]</sup>.另外TGEV的PLP1还具有去泛素酶的特性<sup>[24]</sup>.这对于病毒拮抗宿主细胞的先天和后天免疫反应和促进病毒入胞和释放具有重要意义.MHV的PLP2也具有去泛素的作用,可以抑制I型干扰素的产生<sup>[27]</sup>.

**1.4 nsp4** nsp4是一个跨膜蛋白.猫冠状病毒和小鼠肝炎病毒的nsp4的C-末端部分的晶体结构已有报道<sup>[28,29]</sup>.PEDV与猫冠状病毒的nsp4在该区域的同源性有85%.与MHV的有59%同源性.推测这段区域可能会与某些宿主蛋白相互作用.另外nsp4包括4个疏水的结构域,实验证明均处于脂双层中<sup>[17]</sup>.MHV的nsp4会影响病毒复制所需的双膜囊泡(double-membrane vesicles,DMVs)的正常形成,在DMV的组装和稳定性上起重要作用<sup>[30]</sup>.单独表达的MHV的nsp4定位于ER.而感染病毒时,nsp4位于复制复合体上.MHV的nsp4可以与nsp3和nsp6相互作用,共表达nsp4和nsp3会分别影响这两个蛋白的分布<sup>[31]</sup>.

**1.5 nsp5** nsp5编码3C样蛋白酶(3C-like proteinase,3CLpro),是病毒成熟所必需的蛋白酶.目前有HCoV-229E、HCoV-HKU1、TGEV、SARS-CoV等相关蛋白酶结构和酶/抑制剂复合物结构的相关报道<sup>[32-35]</sup>.PEDV的nsp5与HCoV-229E的nsp5的同源性高达83%,与TGEV和SARS-CoV的nsp5同源性分别为78%和63%.nsp5是抗病毒抑制剂研究的主要热点.对nsp5和他与肽抑制剂复合物的晶体结构的研究可以为进一步设计和优化抑制剂奠定基础.对所有类型的冠状病毒3CLpro的水解肽段的氨基酸偏好性研究可以为设计针对3CLpro的广谱的抑制剂提供理论基础<sup>[36]</sup>.

**1.6 nsp6** nsp6为膜蛋白,理论预测含有7个疏水结构域.但是SARS-CoV编码的nsp6的第6个疏水结构域并不在脂双层中<sup>[17]</sup>.鸡传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus,IBV)的nsp6可以诱导宿主细胞自噬体的形成,促进病毒复制<sup>[37]</sup>.PEDV的nsp6的功能仍有待进一步研究.

**1.7 nsp7和nsp8** 对冠状病毒nsp7和nsp8的研究多数集中在一起.目前已经有SARS-CoV和猫冠状病毒的nsp7/nsp8复合物晶体结构的报道.SARS-CoV的nsp7/nsp8复合物晶体结构显示他们形成8:8的结构<sup>[38]</sup>.带有天然N末端氨基酸的SARS-

CoV病毒的nsp8与nsp7相互作用可以增强病毒编码的RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)的活力, 并且具有引物延伸能力, 但是总活性仍然低于病毒的RdRp的活性. 经典RdRp的基序A和C在nsp8上不存在. nsp8存在两个DNA依赖的RNA引物合成酶(primase)的保守基序D/ExD/E. 实验表明仅前一个保守基序是酶活所必需的<sup>[39]</sup>.

猫冠状病毒nsp7/nsp8复合物结构与SARS-CoV的不同, 呈现2:1的异源3聚体形式. 两个nsp7之间的结构也有所差异. nsp8可以合成6个核苷酸长度的寡聚核苷酸. N端带有GPLG的nsp8 RNA聚合酶活性明显增加. 与nsp7相互作用后, RNA聚合酶的活性进一步增加, 能够合成67个核苷酸. 未经切割的nsp7-10病毒多聚蛋白仍然具有合成6个核苷酸长度的寡聚核苷酸. 因此nsp7和nsp8形成的复合物并不是nsp8的聚合酶活性所必需. 聚合酶反应需要Mg<sup>2+</sup>的参与<sup>[40]</sup>.

PEDV的nsp7和nsp8与猫冠状病毒这两个蛋白间的同源性均为81%, 推测PEDV的nsp7/nsp8的结构可能与猫冠状病毒的更接近.

1.8 nsp9 PEDV的nsp9与HCoV-229E的nsp9的同源性为83%. nsp9在复制复合体中结合单链RNA. HCoV-229E的nsp9形成通过二硫键相连的二聚体<sup>[41]</sup>, 这与SARS-CoV的nsp9的结构不同<sup>[42]</sup>. 突变能够形成二硫键的Cys69为Ala得到的结构与SARS的nsp9的类似, 在结构上呈棒状. 野生型的HCoV-229E的nsp9对寡聚核酸有较强亲和力, 而Cys69Ala或Cys69Ser的突变体只能微弱的结合较长的多聚核苷酸. SARS的nsp9相应位置的突变并不影响核酸的结合<sup>[41]</sup>.

SARS-CoV的nsp9是通过两个平行的 $\alpha$ -螺旋之间的100GXXXG104基序发生相互作用. G100E、G104E和G104V的突变会破坏nsp9的二聚作用, 但是突变体仍然能够结合单链RNA, 只是结合能力有所下降. 因此nsp9的二聚作用并不是结合核酸所必需. 将G100E和G104E通过反向遗传的方式引入病毒, 突变病毒不能存活. 而G104V的突变病毒可以通过回复突变恢复感染能力. nsp9的二聚体形成虽然不是RNA结合所必需的, 但是对于病毒复制至关重要<sup>[43]</sup>.

PEDV的nsp9上仅含有一个半胱氨酸, 这与SARS-CoV和HCoV-229E有所不同.

1.9 nsp10 nsp10是病毒编码的S-腺苷甲硫氨酸依赖型核糖-2'-O'-甲基转移酶的辅助蛋白. 只有这两个蛋白形成复合物时核糖-2'-O'-甲基转

移酶才有活力. 单独存在的nsp10形成12聚体结构. nsp10是锌结合蛋白, 每个单体蛋白中存在两个锌指结构. 和锌整合的氨基酸在I、II和III型的冠状病毒中均保守<sup>[44]</sup>. SARS-CoV的nsp10可以与单链RNA、双链RNA或DNA结合, 所结合的核苷酸序列没有特异性<sup>[45]</sup>. SARS-CoV的nsp10可以和复制复合体中的很多蛋白相互作用, 参与复制复合体的形成<sup>[46]</sup>.

MHV的nsp10体外可以和tRNA、单链RNA、双链和单链DNA结合<sup>[47]</sup>. 研究发现nsp10对MHV的基因组和亚基因组RNA合成至关重要, 同时nsp10也在病毒多聚蛋白的加工过程中起作用<sup>[48]</sup>.

## 2 与病毒基因组复制相关的非结构蛋白

2.1 RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp, nsp11) 非结构蛋白nsp11编码病毒的RNA依赖的RNA聚合酶. RdRp负责病毒基因组的合成. 目前还没有关于PEDV的RdRp的研究报道. TGEV的RdRp可以和nsp2、nsp3和nsp8一起掺入病毒粒子<sup>[49]</sup>. 对SARS-CoV的RdRp的研究表明该酶活性依赖引物, 其功能的行使需要nsp8引物合成酶的参与. SARS-CoV的RdRp结合dsRNA和ssRNA的能力接近<sup>[50]</sup>. 该酶缺乏合成起始能力, 可能与其较为开放的结构和缺少能自发启动合成的保守的启动环区(priming loop)有关<sup>[51]</sup>. 理论预测在SARS-CoV编码的RdRp的400-900位氨基酸区域中含有一个G基序, 这是所有引物依赖的RdRp的标志<sup>[50]</sup>. 研究发现Zn<sup>2+</sup>能够抑制SARS-CoV的RdRp体外活性, RdRp的延伸能力受到抑制, 同时模板结合能力也减弱<sup>[52]</sup>. PEDV的RdRp的功能有待进一步研究.

2.2 解旋酶(helicase, nsp12) 非结构蛋白nsp12为核酸解旋酶/核苷酸三磷酸酶, 属于解旋酶超级家族I. 可以有效地解开RNA和DNA双螺旋. 该酶有多聚的特性<sup>[53]</sup>. 其N端具有锌结合能力, C端为解旋酶区域. 马动脉炎病毒的解旋酶上锌结合区域的突变会导致病毒RNA不能合成, 因此该区域对于解旋酶酶活调节具有重要作用<sup>[54]</sup>.

SARS-CoV的解旋酶解旋的方向是5'-3', 并具有持续解旋能力促进双链RNA和双链DNA的有效分离. 所有天然的核苷酸和脱氧核苷酸都可以作为核苷酸三磷酸酶(NTPase)的底物. 其水解ATP、dATP和GTP的能力较其他核苷酸更有效<sup>[55]</sup>. HCoV-N229E的nsp13除了具有SARS-CoV解旋酶类似特性外, 还具有RNA 5'-三磷酸酶

**■应用要点**  
通过对PEDV各个蛋白的结构和功能进行归纳, 为进一步研究病毒的发病机制以及寻找有效的药物或疫苗的研制提供了一定参考.

### ■同行评价

本综述选题新颖,对猪流行性腹泻病毒的研究有重要意义,故有一定的学术价值。

活力,可能与病毒RNA加帽有关<sup>[56]</sup>。

**2.3 核糖核酸外切酶(exoribonuclease, nsp13)** PEDV的核糖核酸外切酶含有595个氨基酸。序列上包括核糖核酸外切酶基序 I (DE)、基序 II (D)和基序III(D),这个基序最早发现在宿主细胞的DEDD核酸外切酶超级家族中存在,这些家族的一些酶具有纠错能力。冠状病毒编码的核糖核酸外切酶在病毒复制过程中可能起着纠错的功能,以应付庞大的病毒基因组复制过程中可能出现的突变。SARS-CoV的核糖核酸外切酶具有3'-5'外切酶特性。酶的C端结构域具有鸟嘌呤-N7-甲基转移酶的功能<sup>[57,58]</sup>。突变HCoV-229E的核糖核酸外切酶保守基序上的氨基酸会影响病毒基因组和亚基因组RNA合成<sup>[58]</sup>。将MHV或SARS-CoV的核糖核酸外切酶上的基序 I 或III的保守氨基酸突变为丙氨酸后得到的病毒具有中等程度的复制缺陷,表明酶活性不是病毒复制所必需。对病毒序列分析后发现病毒基因组的突变率均有所上升<sup>[59,60]</sup>。这些都表明该酶在维持冠状病毒基因组复制的保真性上具有重要作用。暗示着他可以作为新型的弱毒疫苗开发和抗病毒治疗方法的研究方向<sup>[61]</sup>。

**2.4 尿苷酸特异性核糖核酸内切酶(Uridylate-specific endoribonuclease, nsp14)** 该酶为尼多病毒目病毒所特有<sup>[62]</sup>。PEDV的尿苷酸特异性核糖核酸内切酶与SARS的nsp15有60%同源性。SARS-CoV的nsp15的晶体结构已经解析。nsp15只有形成6聚体才具有相应的酶活<sup>[63]</sup>。他主要切割3'尿苷酸,并形成2'-3'环状磷酸酯末端。其活性依赖Mn<sup>2+</sup>的存在<sup>[64,65]</sup>。酶活力的丧失会导致HCoV-229E不能增殖<sup>[62]</sup>。

SARS-CoV的nsp15可以抑制宿主细胞MAVS诱导的细胞凋亡,从而在病毒的免疫逃逸上起作用<sup>[66]</sup>。猪繁殖与呼吸综合征病毒的nsp11具有尿苷酸特异性核糖核酸内切酶活性,该蛋白可以在细胞上抑制IFN-β的产生<sup>[67]</sup>。PEDV的核糖核酸内切酶是否与病毒的免疫逃逸有关有待验证。

**2.5 S-腺苷甲硫氨酸依赖型核苷-2'-O'-甲基转移酶[S-adenosylmethionine-dependent-(nucleoside-2'-O)-methyltransferase, nsp15]** PEDV的S-腺苷甲硫氨酸依赖型核苷-2'-O'-甲基转移酶与SARS-CoV编码的nsp16的同源性为75%。SARS-CoV的nsp10/nsp16的晶体结构已经报道。冠状病毒的核苷-2'-O'-甲基转移酶只有在和nsp10结合的条件下才具有活性。SARS-CoV

的nsp16只能甲基化m7GpppA-RNA,而不能甲基化m7GpppG-RNA。nsp10是甲基转移酶结合m7GpppA-RNA和S-腺苷甲硫氨酸(SAM)所必需的蛋白。nsp10可以稳定SAM结合部位并扩大甲基转移酶上RNA结合区域<sup>[68,69]</sup>。推测PEDV的核苷-2'-O'-甲基转移酶也只在和nsp10相互作用时才具有活力。

## 3 结构蛋白和ORF3

**3.1 S蛋白(spike protein)** PEDV的S蛋白由1383个氨基酸组成,是识别宿主细胞上的入胞受体、促进病毒与细胞膜融合的蛋白。S蛋白基因在三类冠状病毒中高度保守。S蛋白表面有PEDV重要的抗原决定簇,有良好的免疫原性,在机体抗原免疫反应中起重要作用。该蛋白可以作为疫苗和抗病毒药物开发的靶点。冠状病毒S蛋白为I型膜蛋白。N端S1区域形成3聚体的结构,S2区域结构为螺旋状,形成柄状结构嵌入病毒囊膜中<sup>[70]</sup>。S1区域可识别宿主细胞上的受体,而S2区域与病毒和细胞融合有关,包括七肽重复序列结构域HR1和HR2。S1结合受体后引发S2构象变化,导致融合肽插入细胞膜中。HR1和HR2相互作用形成6螺旋束的融合核心,促使病毒的囊膜靠近细胞膜从而引起融合<sup>[71]</sup>。目前有不少抗病毒的肽来抑制病毒入胞<sup>[72]</sup>。另外能够阻止S蛋白和受体结合的肽也可以作为有效的抗病毒药物<sup>[73]</sup>。

TGEV的S1的N端包括4个抗原位点(C、B、D和A),与宿主受体识别有关。包含C和B位点的S1的N端大部分与肠道细胞嗜性有关。位于S1的C端的A位点与呼吸和肠道细胞嗜性有关,且可以识别入胞受体氨肽酶N(aminopeptidase N, APN)<sup>[74]</sup>。PEDV的受体也是APN。对PEDV受体结合位点的研究发现, PEDV与APN结合的部位可能在25-88位氨基酸上<sup>[75]</sup>。有研究发现PEDV的S蛋白C末端的GPRLQPY序列可以诱导中和抗体产生<sup>[76]</sup>。针对S蛋白上抗原表位的研究对于开发新型疫苗至关重要。

**3.2 ORF3蛋白** ORF3是病毒编码的一个辅助蛋白。预测其含有4个跨膜区并形成同源四聚体。在非洲爪蟾卵母细胞模型上证实PEDV的ORF3具有离子通道特性,第4个跨膜区上的酪氨酸对钾离子通道活性起关键作用。ORF3的基因沉默可以降低病毒在Vero细胞上的滴度<sup>[77]</sup>。有些PEDV毒株的ORF3上存在碱基缺失,因此可以用来作为区分PEDV的一些毒株的标志<sup>[78]</sup>。

3.3 M蛋白 PEDV的M蛋白无信号肽, 预测含有3个跨膜区. M蛋白在TGEV病毒粒子的囊膜中存在两种拓扑模式<sup>[79]</sup>. PEDV和TGEV的M蛋白在跨膜区上保守性相对较高. M蛋白的拓扑结构在两个病毒间是否有类似需要进一步研究.

M蛋白可以和自身、S蛋白和N蛋白相互作用. M蛋白的C端第三跨膜区后有个保守结构域. MHV上的这个结构域可以调节M蛋白自身的相互作用, 在病毒囊膜形成中具有重要作用, 而N蛋白的存在也可以稳定病毒组装过程中M蛋白之间形成复合物<sup>[80]</sup>.

3.4 E蛋白 E蛋白为膜蛋白, 和TGEV的E蛋白的同源性为31%. SARS-CoV的E蛋白体外具有离子通道性质<sup>[81]</sup>. SARS-CoV的E蛋白在单独表达或病毒感染时主要位于内质网-高尔基体中间层(ER-Golgi intermediate compartment, ERGIC). 没有证据表明E蛋白存在于细胞膜上<sup>[82]</sup>. 鸡传染性支气管炎病毒的E蛋白可以影响蛋白的分泌途径, 对病毒释放具有重要作用<sup>[83]</sup>. TGEV的E蛋白对病毒粒子的分泌也有重要作用<sup>[84]</sup>.

3.5 N蛋白 N蛋白与病毒复制有关, 并且与病毒的复制-转录复合体在一起. N蛋白包含两个RNA结合结构域, 分别为N端结构域和C端结构域. 两个结构域之间有一段富含丝氨酸和精氨酸的柔性区域. 目前SARS-CoV、IBV和MHV的两个RNA结合区域的晶体结构已经得到解析. 虽然结构总体上类似, 但是表面静电势有所差别, 这与他们各自结合RNA的特性相关. C端结构域有多聚的趋势<sup>[85-87]</sup>.

MHV的N端结构域可以结合病毒基因组上的转录调节序列, 这是一段保守的6个碱基的序列, 对病毒亚基因组的合成起着重要作用. N端结构域具有RNA解链能力, 为不连续的转录提供条件<sup>[88]</sup>. 最近的研究表明MHV的N蛋白可以与病毒的nsp3的N端相互作用, 作用位点多集中于N蛋白的丝氨酸-精氨酸富集区域. 这种相互作用可能与基因组RNA在病毒感染早期定位于复制复合体有关<sup>[89]</sup>. MHV的N蛋白动态地与复制-转录复合体作用. N蛋白通过C端结构域与复制-转录复合体作用, 并进而与其他N蛋白相互作用. N蛋白间相互作用是其募集至复制-转录复合体所必需. N蛋白包裹病毒基因组RNA形成螺旋状核衣壳掺入出芽的病毒粒子<sup>[90]</sup>. TGEV的N蛋白作为RNA伴侣可以有效地促进模板切换来协助病毒RNA有效转录<sup>[91,92]</sup>.

研究发现1,8-桉树脑(1,8-cineole)可以通过

干扰IBV的N蛋白与RNA的结合来抑制病毒, 提示我们通过干扰N蛋白与RNA结合来控制病毒感染的可能性<sup>[93]</sup>.

## 4 结论

目前对PEDV编码的蛋白研究较少, 还有很多可以拓展的研究空间. 鉴于其与其他冠状病毒的一些相似之处, 可以借鉴其他病毒的研究方法. 通过蛋白质相互作用筛选的方法发现各病毒蛋白间的相互作用以及病毒蛋白与宿主细胞蛋白间的相互作用、病毒复制复合体蛋白组成分析及病毒蛋白对免疫系统的影响等都是PEDV研究的重要环节. 对病毒成熟相关的蛋白酶3CL-pro和复制相关酶的结构和功能研究可以为设计小分子病毒抑制剂提供靶点. 这些研究的结果都将大大促进对PEDV致病机制的研究, 并为研发新型的防控PED的手段提供思路.

## 5 参考文献

- 1 Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, Tobler K. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* 2001; 23: 137-144 [PMID: 11724265 DOI: 10.1023/A:1011831902219]
- 2 Chen J, Wang C, Shi H, Qiu HJ, Liu S, Shi D, Zhang X, Feng L. Complete genome sequence of a Chinese virulent porcine epidemic diarrhea virus strain. *J Virol* 2011; 85: 11538-11539 [PMID: 21980030 DOI: 10.1128/JVI.06024-11]
- 3 Chen J, Liu X, Shi D, Shi H, Zhang X, Feng L. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus variant. *J Virol* 2012; 86: 3408 [PMID: 22354946 DOI: 10.1128/JVI.07150-11]
- 4 Park SJ, Kim HK, Song DS, An DJ, Park BK. Complete genome sequences of a Korean virulent porcine epidemic diarrhea virus and its attenuated counterpart. *J Virol* 2012; 86: 5964 [PMID: 22532530 DOI: 10.1128/JVI.00557-12]
- 5 Wang Y, Shi H, Rigolet P, Wu N, Zhu L, Xi XG, Vabret A, Wang X, Wang T. Nsp1 proteins of group I and SARS coronaviruses share structural and functional similarities. *Infect Genet Evol* 2010; 10: 919-924 [PMID: 20609418 DOI: 10.1016/j.meegid.2010.05.014]
- 6 Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL, Makino S. SARS coronavirus nsp1 protein induces template-dependent endonucleolytic cleavage of mRNAs: viral mRNAs are resistant to nsp1-induced RNA cleavage. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002433 [PMID: 22174690 DOI: 10.1371/journal.ppat.1002433]
- 7 Huang C, Lokugamage KG, Rozovics JM, Narayanan K, Semler BL, Makino S. Alphacoronavirus transmissible gastroenteritis virus nsp1 protein suppresses protein translation in mammalian cells and in cell-free HeLa cell extracts but not in rabbit reticulocyte lysate. *J Virol* 2011; 85: 638-643 [PMID: 21047955 DOI: 10.1128/JVI.01806-10]
- 8 Charley B, Laude H. Induction of alpha interferon by transmissible gastroenteritis coronavirus: role



- of transmembrane glycoprotein E1. *J Virol* 1988; 62: 8-11 [PMID: 2824858]
- 9 Charley B, Lavanant L. Characterization of blood mononuclear cells producing IFN alpha following induction by coronavirus-infected cells (porcine transmissible gastroenteritis virus). *Res Immunol* 1990; 141: 141-151 [PMID: 2167506 DOI: 10.1016/0923-2494(90)90133-J]
  - 10 Spiegel M, Pichlmair A, Martínez-Sobrido L, Cros J, García-Sastre A, Haller O, Weber F. Inhibition of Beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 2005; 79: 2079-2086 [PMID: 15681410 DOI: 10.1128/JVI.79.4.2079-2086.2005]
  - 11 Spiegel M, Weber F. Inhibition of cytokine gene expression and induction of chemokine genes in non-lymphatic cells infected with SARS coronavirus. *Viral J* 2006; 3: 17 [PMID: 16571117 DOI: 10.1186/1743-422X-3-17]
  - 12 Roth-Cross JK, Martínez-Sobrido L, Scott EP, García-Sastre A, Weiss SR. Inhibition of the alpha/beta interferon response by mouse hepatitis virus at multiple levels. *J Virol* 2007; 81: 7189-7199 [PMID: 17459917 DOI: 10.1128/JVI.00013-07]
  - 13 von Brunn A, Teepe C, Simpson JC, Pepperkok R, Friedel CC, Zimmer R, Roberts R, Baric R, Haas J. Analysis of intraviral protein-protein interactions of the SARS coronavirus ORF5e. *PLoS One* 2007; 2: e459 [PMID: 17520018 DOI: 10.1371/journal.pone.0000459]
  - 14 Graham RL, Sims AC, Brockway SM, Baric RS, Denison MR. The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J Virol* 2005; 79: 13399-13411 [PMID: 16227261 DOI: 10.1128/JVI.79.21.13399-13411.2005]
  - 15 Hagemeyer MC, Verheije MH, Ulasli M, Shaltiel IA, de Vries LA, Reggiori F, Rottier PJ, de Haan CA. Dynamics of coronavirus replication-transcription complexes. *J Virol* 2010; 84: 2134-2149 [PMID: 20007278 DOI: 10.1128/JVI.01716-09]
  - 16 Cornillez-Ty CT, Liao L, Yates JR, Kuhn P, Buchmeier MJ. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. *J Virol* 2009; 83: 10314-10318 [PMID: 19640993 DOI: 10.1128/JVI.00842-09]
  - 17 Oostra M, Hagemeyer MC, van Gent M, Bekker CP, te Lintelo EG, Rottier PJ, de Haan CA. Topology and membrane anchoring of the coronavirus replication complex: not all hydrophobic domains of nsp3 and nsp6 are membrane spanning. *J Virol* 2008; 82: 12392-12405 [PMID: 18842706 DOI: 10.1128/JVI.01219-08]
  - 18 Egloff MP, Malet H, Putics A, Heinonen M, Dutartre H, Frangeul A, Gruez A, Campanacci V, Cambillau C, Ziebuhr J, Ahola T, Canard B. Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. *J Virol* 2006; 80: 8493-8502 [PMID: 16912299 DOI: 10.1128/JVI.00713-06]
  - 19 Xu Y, Cong L, Chen C, Wei L, Zhao Q, Xu X, Ma Y, Bartlam M, Rao Z. Crystal structures of two coronavirus ADP-ribose-1"-monophosphatases and their complexes with ADP-Ribose: a systematic structural analysis of the viral ADRP domain. *J Virol* 2009; 83: 1083-1092 [PMID: 18987156 DOI: 10.1128/JVI.01862-08]
  - 20 Piotrowski Y, Hansen G, Boomaars-van der Zanden AL, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Hilgenfeld R. Crystal structures of the X-domains of a Group-1 and a Group-3 coronavirus reveal that ADP-ribose-binding may not be a conserved property. *Protein Sci* 2009; 18: 6-16 [PMID: 19177346]
  - 21 Wojdyla JA, Manolaridis I, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Coutard B, Piotrowski Y, Hilgenfeld R, Tucker PA. Structure of the X (ADRP) domain of nsp3 from feline coronavirus. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2009; 65: 1292-1300 [PMID: 19966415 DOI: 10.1107/S0907444909040074]
  - 22 Putics A, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. Identification of protease and ADP-ribose 1"-monophosphatase activities associated with transmissible gastroenteritis virus non-structural protein 3. *J Gen Virol* 2006; 87: 651-656 [PMID: 16476987]
  - 23 Kuri T, Eriksson KK, Putics A, Züst R, Snijder EJ, Davidson AD, Siddell SG, Thiel V, Ziebuhr J, Weber F. The ADP-ribose-1"-monophosphatase domains of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E mediate resistance to antiviral interferon responses. *J Gen Virol* 2011; 92: 1899-1905 [PMID: 21525212]
  - 24 Wojdyla JA, Manolaridis I, van Kasteren PB, Kikkert M, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Tucker PA. Papain-like protease 1 from transmissible gastroenteritis virus: crystal structure and enzymatic activity toward viral and cellular substrates. *J Virol* 2010; 84: 10063-10073 [PMID: 20668092 DOI: 10.1128/JVI.00898-10]
  - 25 Herold J, Gorbalenya AE, Thiel V, Schelle B, Siddell SG. Proteolytic processing at the amino terminus of human coronavirus 229E gene 1-encoded polypeptides: identification of a papain-like proteinase and its substrate. *J Virol* 1998; 72: 910-918 [PMID: 9444982]
  - 26 Herold J, Siddell SG, Gorbalenya AE. A human RNA viral cysteine proteinase that depends upon a unique Zn<sup>2+</sup>-binding finger connecting the two domains of a papain-like fold. *J Biol Chem* 1999; 274: 14918-14925 [PMID: 10329692 DOI: 10.1074/jbc.274.21.14918]
  - 27 Zheng D, Chen G, Guo B, Cheng G, Tang H. PLP2, a potent deubiquitinase from murine hepatitis virus, strongly inhibits cellular type I interferon production. *Cell Res* 2008; 18: 1105-1113 [PMID: 18957937]
  - 28 Manolaridis I, Wojdyla JA, Panjikar S, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Berglind H, Nordlund P, Coutard B, Tucker PA. Structure of the C-terminal domain of nsp4 from feline coronavirus. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2009; 65: 839-846 [PMID: 19622868 DOI: 10.1107/S0907444909018253]
  - 29 Xu X, Lou Z, Ma Y, Chen X, Yang Z, Tong X, Zhao Q, Xu Y, Deng H, Bartlam M, Rao Z. Crystal structure of the C-terminal cytoplasmic domain of non-structural protein 4 from mouse hepatitis virus A59. *PLoS One* 2009; 4: e6217 [PMID: 19593433 DOI: 10.1371/journal.pone.0006217]
  - 30 Gadlage MJ, Sparks JS, Beachboard DC, Cox RG, Doyle JD, Stobart CC, Denison MR. Murine hepatitis virus nonstructural protein 4 regulates virus-induced membrane modifications and replication complex function. *J Virol* 2010; 84: 280-290 [PMID: 19846526 DOI: 10.1128/JVI.01772-09]
  - 31 Hagemeyer MC, Ulasli M, Vonk AM, Reggiori F,

- Rottier PJ, de Haan CA. Mobility and interactions of coronavirus nonstructural protein 4. *J Virol* 2011; 85: 4572-4577 [PMID: 21345958 DOI: 10.1128/JVI.00042-11]
- 32 Lee CC, Kuo CJ, Ko TP, Hsu MF, Tsui YC, Chang SC, Yang S, Chen SJ, Chen HC, Hsu MC, Shih SR, Liang PH, Wang AH. Structural basis of inhibition specificities of 3C and 3C-like proteases by zinc-coordinating and peptidomimetic compounds. *J Biol Chem* 2009; 284: 7646-7655 [PMID: 19144641 DOI: 10.1074/jbc.M807947200]
- 33 Zhao Q, Li S, Xue F, Zou Y, Chen C, Bartlam M, Rao Z. Structure of the main protease from a global infectious human coronavirus, HCoV-HKU1. *J Virol* 2008; 82: 8647-8655 [PMID: 18562531 DOI: 10.1128/JVI.00298-08]
- 34 Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science* 2003; 300: 1763-1767 [PMID: 12746549 DOI: 10.1126/science.1085658]
- 35 Yang H, Xie W, Xue X, Yang K, Ma J, Liang W, Zhao Q, Zhou Z, Pei D, Ziebuhr J, Hilgenfeld R, Yuen KY, Wong L, Gao G, Chen S, Chen Z, Ma D, Bartlam M, Rao Z. Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases. *PLoS Biol* 2005; 3: e324 [PMID: 16128623 DOI: 10.1371/journal.pbio.0030324]
- 36 Chuck CP, Chow HF, Wan DC, Wong KB. Profiling of substrate specificities of 3C-like proteases from group 1, 2a, 2b, and 3 coronaviruses. *PLoS One* 2011; 6: e27228 [PMID: 22073294 DOI: 10.1371/journal.pone.0027228]
- 37 Cottam EM, Maier HJ, Manifava M, Vaux LC, Chandra-Schoenfelder P, Gerner W, Britton P, Ktistakis NT, Wileman T. Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy* 2011; 7: 1335-1347 [PMID: 21799305 DOI: 10.4161/auto.7.11.16642]
- 38 Zhai Y, Sun F, Li X, Pang H, Xu X, Bartlam M, Rao Z. Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12: 980-986 [PMID: 16228002]
- 39 te Velthuis AJ, van den Worm SH, Snijder EJ. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 1737-1747 [PMID: 22039154 DOI: 10.1093/nar/gkr893]
- 40 Xiao Y, Ma Q, Restle T, Shang W, Svergun DI, Ponnusamy R, Sczakiel G, Hilgenfeld R. Nonstructural proteins 7 and 8 of feline coronavirus form a 2:1 heterotrimer that exhibits primer-independent RNA polymerase activity. *J Virol* 2012; 86: 4444-4454 [PMID: 22318142 DOI: 10.1128/JVI.06635-11]
- 41 Ponnusamy R, Moll R, Weimar T, Mesters JR, Hilgenfeld R. Variable oligomerization modes in coronavirus non-structural protein 9. *J Mol Biol* 2008; 383: 1081-1096 [PMID: 18694760 DOI: 10.1016/j.jmb.2008.07.071]
- 42 Sutton G, Fry E, Carter L, Sainsbury S, Walter T, Nettleship J, Berrow N, Owens R, Gilbert R, Davidson A, Siddell S, Poon LL, Diprose J, Alderton D, Walsh M, Grimes JM, Stuart DI. The nsp9 replicase protein of SARS-coronavirus, structure and functional insights. *Structure* 2004; 12: 341-353 [PMID: 14962394]
- 43 Miknis ZJ, Donaldson EF, Umland TC, Rimmer RA, Baric RS, Schultz LW. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp9 dimerization is essential for efficient viral growth. *J Virol* 2009; 83: 3007-3018 [PMID: 19153232 DOI: 10.1128/JVI.01505-08]
- 44 Su D, Lou Z, Sun F, Zhai Y, Yang H, Zhang R, Joachimiak A, Zhang XC, Bartlam M, Rao Z. Dodecamer structure of severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10. *J Virol* 2006; 80: 7902-7908 [PMID: 16873247 DOI: 10.1128/JVI.00483-06]
- 45 Joseph JS, Saikatendu KS, Subramanian V, Neuman BW, Brooun A, Griffith M, Moy K, Yadav MK, Velasquez J, Buchmeier MJ, Stevens RC, Kuhn P. Crystal structure of nonstructural protein 10 from the severe acute respiratory syndrome coronavirus reveals a novel fold with two zinc-binding motifs. *J Virol* 2006; 80: 7894-7901 [PMID: 16873246 DOI: 10.1128/JVI.00467-06]
- 46 Pan J, Peng X, Gao Y, Li Z, Lu X, Chen Y, Ishaq M, Liu D, Dediego ML, Enjuanes L, Guo D. Genome-wide analysis of protein-protein interactions and involvement of viral proteins in SARS-CoV replication. *PLoS One* 2008; 3: e3299 [PMID: 18827877 DOI: 10.1371/journal.pone.0003299]
- 47 Matthes N, Mesters JR, Coutard B, Canard B, Snijder EJ, Moll R, Hilgenfeld R. The non-structural protein Nsp10 of mouse hepatitis virus binds zinc ions and nucleic acids. *FEBS Lett* 2006; 580: 4143-4149 [PMID: 16828088 DOI: 10.1016/j.febslet.2006.06.061]
- 48 Donaldson EF, Sims AC, Graham RL, Denison MR, Baric RS. Murine hepatitis virus replicase protein nsp10 is a critical regulator of viral RNA synthesis. *J Virol* 2007; 81: 6356-6368 [PMID: 17392363 DOI: 10.1128/JVI.02805-06]
- 49 Nogales A, Márquez-Jurado S, Galán C, Enjuanes L, Almazán F. Transmissible gastroenteritis coronavirus RNA-dependent RNA polymerase and nonstructural proteins 2, 3, and 8 are incorporated into viral particles. *J Virol* 2012; 86: 1261-1266 [PMID: 22090122 DOI: 10.1128/JVI.06428-11]
- 50 te Velthuis AJ, Arnold JJ, Cameron CE, van den Worm SH, Snijder EJ. The RNA polymerase activity of SARS-coronavirus nsp12 is primer dependent. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 203-214 [PMID: 19875418 DOI: 10.1093/nar/gkp904]
- 51 Hong Z, Cameron CE, Walker MP, Castro C, Yao N, Lau JY, Zhong W. A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase. *Virology* 2001; 285: 6-11 [PMID: 11414800 DOI: 10.1006/viro.2001.0948]
- 52 te Velthuis AJ, van den Worm SH, Sims AC, Baric RS, Snijder EJ, van Hemert MJ. Zn(2+) inhibits coronavirus and arterivirus RNA polymerase activity in vitro and zinc ionophores block the replication of these viruses in cell culture. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001176 [PMID: 21079686 DOI: 10.1371/journal.ppat.1001176]
- 53 Lee NR, Kwon HM, Park K, Oh S, Jeong YJ, Kim DE. Cooperative translocation enhances the unwinding of duplex DNA by SARS coronavirus helicase nsP13. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 7626-7636 [PMID: 20671029 DOI: 10.1093/nar/gkq647]
- 54 Seybert A, Posthuma CC, van Dinten LC, Snijder EJ, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. A complex zinc finger controls the enzymatic activities of nidovirus helicases. *J Virol* 2005; 79: 696-704 [PMID: 15613297]

- DOI: 10.1128/JVI.79.2.696-704.2005]
- 55 Ivanov KA, Thiel V, Dobbe JC, van der Meer Y, Snijder EJ, Ziebuhr J. Multiple enzymatic activities associated with severe acute respiratory syndrome coronavirus helicase. *J Virol* 2004; 78: 5619-5632 [PMID: 15140959 DOI: 10.1128/JVI.78.11.5619-5632.2004]
- 56 Ivanov KA, Ziebuhr J. Human coronavirus 229E nonstructural protein 13: characterization of duplex-unwinding, nucleoside triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities. *J Virol* 2004; 78: 7833-7838 [PMID: 15220459 DOI: 10.1128/JVI.78.14.7833-7838.2004]
- 57 Minskaia E, Hertzog T, Gorbalenya AE, Campanacci V, Cambillau C, Canard B, Ziebuhr J. Discovery of an RNA virus 3'-&gt; 5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5108-5113 [PMID: 16549795 DOI: 10.1073/pnas.0508200103]
- 58 Chen Y, Cai H, Pan J, Xiang N, Tien P, Ahola T, Guo D. Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3484-3489 [PMID: 19208801 DOI: 10.1073/pnas.0808790106]
- 59 Eckerle LD, Becker MM, Halpin RA, Li K, Venter E, Lu X, Scherbakova S, Graham RL, Baric RS, Stockwell TB, Spiro DJ, Denison MR. Infidelity of SARS-CoV Nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000896 [PMID: 20463816 DOI: 10.1371/journal.ppat.1000896]
- 60 Eckerle LD, Lu X, Sperry SM, Choi L, Denison MR. High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exoribonuclease mutants. *J Virol* 2007; 81: 12135-12144 [PMID: 17804504 DOI: 10.1128/JVI.01296-07]
- 61 Denison MR, Graham RL, Donaldson EF, Eckerle LD, Baric RS. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol* 2011; 8: 270-279 [PMID: 21593585 DOI: 10.4161/rna.8.2.15013]
- 62 Ivanov KA, Hertzog T, Rozanov M, Bayer S, Thiel V, Gorbalenya AE, Ziebuhr J. Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 12694-12699 [PMID: 15304651 DOI: 10.1073/pnas.0403127101]
- 63 Joseph JS, Saikatendu KS, Subramanian V, Neuman BW, Buchmeier MJ, Stevens RC, Kuhn P. Crystal structure of a monomeric form of severe acute respiratory syndrome coronavirus endonuclease nsp15 suggests a role for hexamerization as an allosteric switch. *J Virol* 2007; 81: 6700-6708 [PMID: 17409150 DOI: 10.1128/JVI.02817-06]
- 64 Bhardwaj K, Sun J, Holzenburg A, Guarino LA, Kao CC. RNA recognition and cleavage by the SARS coronavirus endoribonuclease. *J Mol Biol* 2006; 361: 243-256 [PMID: 16828802 DOI: 10.1016/j.jmb.2006.06.021]
- 65 Bhardwaj K, Guarino L, Kao CC. The severe acute respiratory syndrome coronavirus Nsp15 protein is an endoribonuclease that prefers manganese as a cofactor. *J Virol* 2004; 78: 12218-12224 [PMID: 15507608 DOI: 10.1128/JVI.78.22.12218-12224.2004]
- 66 Lei Y, Moore CB, Liesman RM, O'Connor BP, Bergstralh DT, Chen ZJ, Pickles RJ, Ting JP. MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. *PLoS One* 2009; 4: e5466 [PMID: 19404494 DOI: 10.1371/journal.pone.0005466]
- 67 Shi X, Wang L, Li X, Zhang G, Guo J, Zhao D, Chai S, Deng R. Endoribonuclease activities of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nsp11 was essential for nsp11 to inhibit IFN- $\beta$  induction. *Mol Immunol* 2011; 48: 1568-1572 [PMID: 21481939 DOI: 10.1016/j.molimm.2011.03.004]
- 68 Decroly E, Debarnot C, Ferron F, Bouvet M, Coutard B, Imbert I, Gluais L, Papageorgiou N, Sharff A, Bricogne G, Ortiz-Lombardia M, Lescar J, Canard B. Crystal structure and functional analysis of the SARS-coronavirus RNA cap 2'-O-methyltransferase nsp10/nsp16 complex. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002059 [PMID: 21637813 DOI: 10.1371/journal.ppat.1002059]
- 69 Chen Y, Su C, Ke M, Jin X, Xu L, Zhang Z, Wu A, Sun Y, Yang Z, Tien P, Ahola T, Liang Y, Liu X, Guo D. Biochemical and structural insights into the mechanisms of SARS coronavirus RNA ribose 2'-O-methylation by nsp16/nsp10 protein complex. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002294 [PMID: 22022266 DOI: 10.1371/journal.ppat.1002294]
- 70 Beniac DR, Andonov A, Grudeski E, Booth TF. Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 751-752 [PMID: 16845391 DOI: 10.1038/nsmb1123]
- 71 Supekar VM, Bruckmann C, Ingallinella P, Bianchi E, Pessi A, Carfi A. Structure of a proteolytically resistant core from the severe acute respiratory syndrome coronavirus S2 fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 17958-17963 [PMID: 15604146 DOI: 10.1073/pnas.0406128102]
- 72 Liu S, Xiao G, Chen Y, He Y, Niu J, Escalante CR, Xiong H, Farmer J, Debnath AK, Tien P, Jiang S. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet* 2004; 363: 938-947 [PMID: 15043961 DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15788-7]
- 73 Struck AW, Axmann M, Pfefferle S, Drosten C, Meyer B. A hexapeptide of the receptor-binding domain of SARS corona virus spike protein blocks viral entry into host cells via the human receptor ACE2. *Antiviral Res* 2012; 94: 288-296 [PMID: 22265858 DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.12.012]
- 74 Reguera J, Ordoño D, Santiago C, Enjuanes L, Casanovas JM. Antigenic modules in the N-terminal S1 region of the transmissible gastroenteritis virus spike protein. *J Gen Virol* 2011; 92: 1117-1126 [PMID: 21228126 DOI: 10.1099/vir.0.027607-0]
- 75 Lee DK, Cha SY, Lee C. The N-terminal Region of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Spike Protein is Important for the Receptor Binding. *Korean J Microbiol Biotechnol* 2011; 39: 140-145
- 76 Cruz DJ, Kim CJ, Shin HJ. The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize Porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res* 2008; 132: 192-196 [PMID: 18067984 DOI: 10.1016/j.virusres.2007.10.015]
- 77 Wang K, Lu W, Chen J, Xie S, Shi H, Hsu H, Yu W, Xu K, Bian C, Fischer WB, Schwarz W, Feng L, Sun B. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production. *FEBS Lett* 2012; 586: 384-391 [PMID: 22245155 DOI: 10.1016/j.febslet.2012.01.005]
- 78 Chen J, Wang C, Shi H, Qiu H, Liu S, Chen X, Zhang Z, Feng L. Molecular epidemiology of

- porcine epidemic diarrhea virus in China. *Arch Virol* 2010; 155: 1471-1476 [PMID: 20544234 DOI: 10.1007/s00705-010-0720-2]
- 79 Escors D, Camafeita E, Ortego J, Laude H, Enjuanes L. Organization of two transmissible gastroenteritis coronavirus membrane protein topologies within the virion and core. *J Virol* 2001; 75: 12228-12240 [PMID: 11711614 DOI: 10.1128/JVI.75.24.12228-12240.2001]
- 80 Arndt AL, Larson BJ, Hogue BG. A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly. *J Virol* 2010; 84: 11418-11428 [PMID: 20719948 DOI: 10.1128/JVI.01131-10]
- 81 Pervushin K, Tan E, Parthasarathy K, Lin X, Jiang FL, Yu D, Vararattanavech A, Soong TW, Liu DX, Torres J. Structure and inhibition of the SARS coronavirus envelope protein ion channel. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000511 [PMID: 19593379 DOI: 10.1371/journal.ppat.1000511]
- 82 Nieto-Torres JL, Dediego ML, Alvarez E, Jiménez-Guardaño JM, Regla-Nava JA, Llorente M, Kremer L, Shuo S, Enjuanes L. Subcellular location and topology of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein. *Virology* 2011; 415: 69-82 [PMID: 21524776 DOI: 10.1016/j.virol.2011.03.029]
- 83 Ruch TR, Machamer CE. The hydrophobic domain of infectious bronchitis virus E protein alters the host secretory pathway and is important for release of infectious virus. *J Virol* 2011; 85: 675-685 [PMID: 21047962 DOI: 10.1128/JVI.01570-10]
- 84 Ortego J, Ceriani JE, Patiño C, Plana J, Enjuanes L. Absence of E protein arrests transmissible gastroenteritis coronavirus maturation in the secretory pathway. *Virology* 2007; 368: 296-308 [PMID: 17692883 DOI: 10.1016/j.virol.2007.05.032]
- 85 Huang Q, Yu L, Petros AM, Gunasekera A, Liu Z, Xu N, Hajduk P, Mack J, Fesik SW, Olejniczak ET. Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein. *Biochemistry* 2004; 43: 6059-6063 [PMID: 15147189 DOI: 10.1021/bi036155b]
- 86 Fan H, Ooi A, Tan YW, Wang S, Fang S, Liu DX, Lescar J. The nucleocapsid protein of coronavirus infectious bronchitis virus: crystal structure of its N-terminal domain and multimerization properties. *Structure* 2005; 13: 1859-1868 [PMID: 16338414 DOI: 10.1016/j.str.2005.08.021]
- 87 Ma Y, Tong X, Xu X, Li X, Lou Z, Rao Z. Structures of the N- and C-terminal domains of MHV-A59 nucleocapsid protein corroborate a conserved RNA-protein binding mechanism in coronavirus. *Protein Cell* 2010; 1: 688-697 [PMID: 21203940 DOI: 10.1007/s13238-010-0079-x]
- 88 Grosseohme NE, Li L, Keane SC, Liu P, Dann CE, Leibowitz JL, Giedroc DP. Coronavirus N protein N-terminal domain (NTD) specifically binds the transcriptional regulatory sequence (TRS) and melts TRS-cTRS RNA duplexes. *J Mol Biol* 2009; 394: 544-557 [PMID: 19782089 DOI: 10.1016/j.jmb.2009.09.040]
- 89 Hurst KR, Ye R, Goebel SJ, Jayaraman P, Masters PS. An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. *J Virol* 2010; 84: 10276-10288 [PMID: 20660183 DOI: 10.1128/JVI.01287-10]
- 90 Verheije MH, Hagemeijer MC, Ulasli M, Reggiori F, Rottier PJ, Masters PS, de Haan CA. The coronavirus nucleocapsid protein is dynamically associated with the replication-transcription complexes. *J Virol* 2010; 84: 11575-11579 [PMID: 20739524 DOI: 10.1128/JVI.00569-10]
- 91 Zúñiga S, Cruz JL, Sola I, Mateos-Gómez PA, Palacio L, Enjuanes L. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. *J Virol* 2010; 84: 2169-2175 [PMID: 19955314 DOI: 10.1128/JVI.02011-09]
- 92 Zúñiga S, Sola I, Moreno JL, Sabella P, Plana-Durán J, Enjuanes L. Coronavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone. *Virology* 2007; 357: 215-227 [PMID: 16979208 DOI: 10.1016/j.virol.2006.07.046]
- 93 Yang Z, Wu N, Fu Y, Yang G, Wang W, Zu Y, Efferth T. Anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of 1,8-cineole: effect on nucleocapsid (N) protein. *J Biomol Struct Dyn* 2010; 28: 323-330 [PMID: 20919748 DOI: 10.1080/07391102.2010.10507362]

编辑 李军亮 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》被评为中国精品科技期刊

本刊讯 2011-12-02, 中国科学技术信息研究所在北京发布2010年中国科技论文统计结果, 经过中国精品科技期刊遴选指标体系综合评价, 《世界华人消化杂志》被评为2011年度中国精品科技期刊. 中国精品科技期刊以其整体的高质量示范作用, 带动我国科技期刊学术水平的提高. 精品科技期刊的遴选周期为三年. (编辑部主任: 李军亮 2012-01-01)

# 猪流行性腹泻病毒的基因结构及其诊断技术

范京惠, 左玉柱, 任晓峰

## ■背景资料

猪流行性腹泻病目前在亚洲地区尤其是韩国、日本和中国的流行较为严重, 给养猪业带来严重的经济损失。由于PED临床诊断困难, 建立实验室诊断技术, 对该病的确诊具有重要意义。

范京惠, 左玉柱, 河北农业大学动物医学院 河北省保定市071001  
任晓峰, 东北农业大学动物医学学院预防兽医系 黑龙江省哈尔滨市 150030  
范京惠, 副教授, 主要从事兽医微生物学教学、科研及社会服务工作。  
国家自然科学基金资助项目, No. 31272593  
河北省高等学校科学研究计划基金资助项目, No. 2011180  
作者贡献分布: 本文综述由范京惠完成; 左玉柱与任晓峰审核。  
通讯作者: 左玉柱, 副教授, 071001, 河北省保定市灵雨寺街289号, 河北农业大学动物医学院, zuoyuzhu@163.com  
收稿日期: 2012-09-17 修回日期: 2012-12-30  
接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-08

## Progress in research of genetic characteristics of porcine epidemic diarrhea virus and diagnostic methods for porcine epidemic diarrhea

Jing-Hui Fan, Yu-Zhu Zuo, Xiao-Feng Ren

Jing-Hui Fan, Yu-Zhu Zuo, College of Veterinary Medicine, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei Province, China

Xiao-Feng Ren, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 31272593; Scientific Research of the Higher Institutions of Hebei Province, No. 2011180

Correspondence to: Yu-Zhu Zuo, Associate Professor, College of Veterinary Medicine, Agricultural University of Hebei, 289 Lingyansi Street, Baoding 071001, Hebei Province, 2011180, China. zuoyuzhu@163.com

Received: 2012-09-17 Revised: 2012-12-30

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-08

## Abstract

Porcine epidemic diarrhea (PED), caused by PED virus (PEDV), is a devastating contagious viral swine disease that is characterized by acute enteritis and lethal watery diarrhea. In Asia (such as Korea, Japan, and China), PEDV causes a very high mortality in suckling piglets. Some affected farms lost 100% of newborn piglets. PED can hardly be distinguished from transmissible gastroenteritis clinically and histopathologically. Identification of the causal agent is a basic prerequisite both for introduction of immunoprophylactic measures and for evaluation of prevention measures. Therefore, rapid

differential diagnosis of PED and TGE is important. The purpose of the current review is to describe the molecular and genetic characteristics of PEDV, and discuss the diagnosis methods for PED.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Porcine epidemic diarrhea; Genetic structure; Diagnostic methods

Fan JH, Zuo YZ, Ren XF. Progress in research of genetic characteristics of porcine epidemic diarrhea virus and diagnostic methods for porcine epidemic diarrhea. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 54-59

## 摘要

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(PED virus, PEDV)引起的猪的一种高度接触性肠道传染病, 以呕吐、水样腹泻和脱水为特征, 在亚洲地区尤其是我国养猪场的感染非常严重。猪流行性腹泻的流行病学特征、临床症状以及病理变化与猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis of swine, TGE)非常相似, 确诊需要借助实验室检测。近年来, 随着分子生物学技术的发展和人们对PEDV基因结构及功能认识的深入, PED的诊断技术也取得了很大进展。本文主要对PEDV的基因结构、功能以及诊断技术方面取得的新进展进行综述, 以期为PEDV基因的深入研究以及建立特异、快速、简便的诊断方法提供新的思路。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒; 基因结构; 诊断方法

范京惠, 左玉柱, 任晓峰. 猪流行性腹泻病毒的基因结构及其诊断技术. *世界华人消化杂志* 2013; 21(1): 54-59

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/54.asp>

## 0 引言

猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(PED virus, PEDV)引起的以腹泻、呕吐、脱水和对哺乳仔猪高致死率

## ■同行评议者

任浩, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

为主要特征的一种高度接触性肠道传染病。本病多发于冬春季节, 不同年龄和不同品系的猪对其均易感, 但以哺乳仔猪发病和死亡最为严重。PED于1971年首次爆发于英格兰的架子猪和育肥猪群<sup>[1]</sup>。1978年由Debouck等<sup>[2]</sup>从患病猪的病料中分离出该病的病原, 命名为CV777株, 并证实其对哺乳仔猪和育肥猪均有致病性。而后, 匈牙利、西德、加拿大、韩国、日本等国相继报道有本病的发生<sup>[3,4]</sup>, 至今在北美和南美还未能证明PEDV的存在。近年来, 该病主要流行于亚洲国家如韩国、中国和日本等国。欧洲各国虽然仍有PED的发生, 但在哺乳仔猪的流行日渐减少, 主要集中在架子猪、育肥猪和青年种猪, 死亡率很低。而在亚洲, 则发生了可感染所有日龄且哺乳仔猪高死亡率的PED, 危害较为严重<sup>[3,4]</sup>。1994年对韩国7个省屠宰场的469份血清进行血清学检测发现, PEDV的抗体平均阳性率为45%, 表明PEDV在韩国一些地区呈地方性流行<sup>[5]</sup>。1993-09/1994-06, 在日本流行的PED, 导致的哺乳仔猪死亡率为30%-80%<sup>[6,7]</sup>。2007-2008年泰国发生的PED, 则导致近100%的感染仔猪死亡。我国于1980年首次分离到PEDV, 其后许多地区均报道有该病的发生。杨群等<sup>[8]</sup>对来自10省市的158份临床猪粪样的检测结果表明, 我国很多猪场普遍存在PEDV, 其感染率达53.2%<sup>[8]</sup>。于晓龙<sup>[9]</sup>对113份疑似PEDV的病料进行检测, 结果38份样本表现为PEDV阳性, 阳性率为33.6%。Li等<sup>[10]</sup>对华南6个省48个猪场的127份样本检测, PEDV的阳性率为43.0%。而2011年在河北省流行的仔猪腹泻中, PEDV的阳性率为62.2%, 部分猪场感染PEDV的哺乳仔猪死亡率高达100%<sup>[11]</sup>。近年来, 该病的流行区域有逐渐扩大的趋势, 而且在PEDV疫苗免疫的猪群亦不断发生<sup>[11,12]</sup>, 给养猪业造成了严重的经济损失。对PED进行确诊以及监测是防控该病的重要环节, 由于PED与猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis of swine, TGE)在流行病学、临床症状、病理变化以及病毒形态等方面非常相似, 临床鉴别诊断困难, 故确诊需要结合试验室诊断方法。本文就目前PEDV的分子生物学特点及实验室诊断方法方面进行综述。

## 1 PEDV基因组结构及功能

PEDV属于冠状病毒科、冠状病毒属, 病毒基因组为不分节段的单股正链RNA, 具有感染性, 整个基因组为28 033 nt<sup>[13]</sup>。5'端有一个帽子

结构(cap), 3'端有一个poly(A)尾。5'端的非翻译区长296 bp, 包含一个65-98 nt的前导序列、1个以AUG为起始密码子、并拥有Kozak序列(GUUCAUGC)。3'端非翻译区长334 nt, 含有由8个碱基(GGAAGAGC)组成的保守序列, 起始于poly(A)上游的73 nt处。其余的基因组包括至少7个开放阅读框(ORFs), 分别编码4种结构蛋白(纤突蛋白S、小膜蛋白E、膜糖蛋白M和核衣壳蛋白N)和3种非结构蛋白(复制酶多聚蛋白Pol(1a/1b)和ORF3蛋白), 在基因组上的排列顺序为: 5'-Pol(1a/1b)-S-ORF3-E-M-N-3', 每相邻两基因之间存在有间隔序列<sup>[13]</sup>。复制酶多聚蛋白基因占全基因组的2/3, 包括2个开放阅读框ORF1a和ORF1b, 二者之间有46 nt的重叠序列, 重叠处有滑动序列(UUUAAC)和假结结构, 能使核糖体进行移码阅读, 从而保证Pol基因的正确翻译。位于E基因与S基因之间的ORF3, 编码一个未知功能且具有多态性的产物, 不同的冠状病毒, 其大小和序列不同<sup>[14,15]</sup>。

**1.1 S基因及S蛋白功能特性** S蛋白由1 383个氨基酸组成, 是位于病毒粒子表面的纤突糖蛋白, 含有27-29个潜在的糖基化位点, 同其他冠状病毒相似, 从N端到C端分成3个结构域, 即大的外部结构域、转膜结构域和短的羧基末端细胞质结构域。由于缺乏蛋白水解位点, PEDV不能像其他冠状病毒一样被切割成S1和S2亚基, 但是根据其他冠状病毒S蛋白保守的基序, 也可以将PEDV S蛋白划分为S1(第1-789位氨基酸)和S2(第790-1 383位氨基酸)2个结构域<sup>[16]</sup>。S1区位于蛋白的表面, 能与宿主细胞上的受体结合, 介导抗体尤其是中和抗体的产生, 而位于病毒内部的S2区则介导病毒与宿主细胞的融合, 很少介导产生特异性抗体。S蛋白羧基末端细胞质结构域主要是由疏水氨基酸组成的疏水区, 对整个S蛋白起固定作用。外部结构域有介导机体产生中和抗体的抗原表位和与宿主细胞表面大分子结合的受体结合域, 在病毒粒子识别靶细胞、与细胞表面受体结合并介导病毒进入以及在宿主体内诱导产生中和抗体方面具有重要作用, 是研制PEDV有效疫苗的重要靶抗原<sup>[17]</sup>。Chang等<sup>[18]</sup>根据TGEV S基因的中和表位区序列信息, 初步鉴定了PEDV S基因一个抗原表位区(第499-638位氨基酸); Cruz等<sup>[19]</sup>利用噬菌体随机肽库, 鉴定了PEDV S蛋白的一个模拟表位(第1 368-1 374位氨基酸); Sun等<sup>[20]</sup>利用制备的6株PEDV S蛋白特异性单克隆抗体对构建的PEDV S1基因特异性

**■研发前沿**  
国内外学者对于PEDV诊断的研究, 集中在以基因或蛋白为基础的分子生物学或血清学诊断方法的研究, RT-PCR、RT-LAMP、RFLP、ELISA和免疫层析法等相继出现, 但检测方法的特异性、敏感性和稳定性等方面则有待进一步研究。

### ■创新盘点

本文不仅阐述了PEDV各基因在诊断中的作用,还深入阐述了目前国内外正在研究的以基因或蛋白为基础的诊断方法。

肽库进行淘选,并结合肽扫描技术,最终鉴定2个中和表位(748-755位氨基酸和764-771位氨基酸),为表位疫苗的研制奠定了基础。研究发现,氨基肽酶(aminopeptidase N, APN)是冠状病毒的感染受体,属于I群冠状病毒的猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、人冠状病毒229E、猫冠状病毒等均以各自宿主的氨基肽酶作为细胞感染受体<sup>[21,22]</sup>, PEDV S蛋白第249-529位氨基酸区域则是pAPN细胞受体的一个潜在的结合区域<sup>[23]</sup>。

依据S基因可确定PEDV不同分离株之间的遗传、进化关系等<sup>[24]</sup>。Park等<sup>[25]</sup>比较了45个韩国分离株的S基因上651 bp的基因片段,结果显示核苷酸相似性在88.7%-96.7%之间。另有研究表明,感染PEDV猪的血清中,抗S蛋白的抗体比抗N蛋白的抗体更为持久,可在更长的时间内检测到抗S蛋白的抗体<sup>[26,27]</sup>。而且PEDV的S蛋白与TGEV S蛋白的同源性非常低,二者在血清学上没有交叉反应,为以检测S蛋白抗体为基础的PEDV检测方法的建立提供了依据。

#### 1.2 ORF3基因及ORF3蛋白功能特性

ORF3基因编码尾部有6个His、具有223或224个氨基酸的非结构蛋白,其功能目前了解较少。已知ORF3至少存在3个可变区,每个可变区都有2-7个核苷酸的缺失。缺失试验证明,ORF3的产物对在体外细胞培养中的病毒复制来说是非必需的,相反,该蛋白的表达,会降低病毒体外培养适应性。已有研究显示,ORF3与病毒毒力有关。Song等<sup>[15]</sup>通过对野生型和致弱毒株ORF3序列进行比较,发现经过致弱后的毒株均有17个氨基酸的缺失,该缺失可作为病毒适应细胞和弱化的一个重要标志<sup>[14]</sup>。因此,可通过检测ORF3基因的差异,对PEDV进行流行病学研究,同时该缺失也为强弱毒株鉴别诊断方法建立提供了依据。

#### 1.3 M基因及M蛋白功能特性

M基因全长681 bp,编码由226个氨基酸组成的结构蛋白,该基因高度保守。对M基因的序列比较分析表明,CV777和Br1/87核苷酸序列仅有1个核苷酸的差异。黑龙江地方分离株LJB/03的M基因序列与其他已公布发表的各地方分离株的同源性均在96%以上<sup>[28]</sup>。Chen等<sup>[12]</sup>2006年分离的6株PEDV之间的M基因核苷酸同源性的98.8%-100%,与参考毒株的同源性为97.2%-99.4%,Li等<sup>[10]</sup>对我国华南地区分离的毒株M基因核苷酸进行比较,同源性为96.1%-100%。Fan等<sup>[11]</sup>2011年从河北省分离的7株PEDV之间M基因同源性为99.4%-99.9%,且

与韩国和泰国毒株的关系较近。以上研究表明,M基因高度保守,这为以检测M基因为基础的PEDV检测方法建立奠定了基础。

M基因编码的M蛋白在病毒粒子的组装和出芽过程中具有重要作用,是一种跨膜糖蛋白。在补体存在的条件下,抗M蛋白的单克隆抗体能中和病毒的感染性。另外,M蛋白能介导机体产生 $\alpha$ 干扰素<sup>[29]</sup>,因此M蛋白可以作为PEDV基因工程疫苗的候选抗原。

#### 1.4 N基因及N蛋白功能特性

PEDV的N基因高度保守,CV777和Br1/87两个分离株N基因序列仅有2个碱基的差异,LJB/03株与其他毒株的同源性也均在95%以上。N蛋白为磷酸化的核衣壳蛋白,在病毒RNA合成过程中发挥重要作用,且N蛋白在PEDV的结构蛋白中所占比例最大,在感染的细胞中能大量表达。猪在感染PEDV的早期,体内就能产生抗N蛋白的高水平抗体<sup>[30]</sup>,所以利用N蛋白来建立PEDV诊断技术具有很好的应用前景。

## 2 PEDV诊断技术

由于PED的临床症状和病理变化与TGE极为相似,因此PED的确诊需要进行实验室诊断。病毒分离、免疫电镜观察、病毒的中和试验、免疫荧光技术等都已用于PEDV抗原或其抗体的检测,这些方法均能对PED做出准确的诊断,但这些技术操作复杂而且耗时<sup>[31]</sup>。随着分子生物学的发展,PCR和ELISA等技术已应用到PEDV诊断技术中。

#### 2.1 PCR技术

Ishikawa等<sup>[32]</sup>根据S基因序列设计了一对可扩增854 bp目的片段的引物,成功地建立了诊断PEDV的RT-PCR法。Kubota等<sup>[33]</sup>和Jung等<sup>[34]</sup>以M基因和N基因为靶基因建立了RT-PCR方法来检测PEDV,在粪便样品中能检测到PEDV的最低含量为100TCID<sub>50</sub>/mL。在韩国已建立了TGEV和PEDV的二联RT-PCR诊断方法,可同时检测出10TCID<sub>50</sub>/mL的TGEV和PEDV<sup>[31]</sup>。Kim等<sup>[35]</sup>还建立了鉴别TGEV和PEDV的多重巢式RT-PCR法,此方法适用于检测福尔马林固定的组织,以原位杂交法作对照,结果显示二者检出率完全一致。Song等<sup>[36]</sup>建立了鉴别诊断PEDV、TGEV和猪轮状病毒的多重反转录PCR(Multi-RT PCR),为鉴别3种病毒性腹泻病原的混合感染提供了技术支持,同时又建立了检测PEDV的实时荧光定量PCR,对仔猪体内PEDV的病毒载量进行了定量。Lee等<sup>[37]</sup>建立

的一步法多重RT-PCR技术,可快速区别检测PEDV. Ben Salem等<sup>[38]</sup>建立的多重巢式RT-PCR法,可检测100TCID<sub>50</sub>/mL的TGEV、10TCID<sub>50</sub>/mL的PRV和27.2 mg/mL的PEDV RNA,为猪肠炎病毒检测提供了一种快速、敏感的诊断方法.以上RT-PCR方法的建立,为PEDV的实验室检测提供了有效的方法,但由于RT-PCR需要使用PCR仪,且需要专业人员进行操作,所以该方法不便于在猪场大面积推广应用.

**2.2 RT-LAMP技术** RT-LAMP是以RT为基础的环介导等温扩增技术,该方法可在等温的条件下进行自动循环的链置换核酸扩增反应. Ren等<sup>[39]</sup>建立的RT-LAMP方法既能从临床病料中检测PEDV,又能区分TGEV、PRV、PRRSV及猪的伪狂犬病毒,比RT-PCR技术及ELISA方法更为敏感.

**2.3 ELISA方法** 酶联免疫吸附试验(ELISA)法既可直接检测抗原,又可检测血清中的抗体,在许多疫病的诊断和检测中广泛应用.由于PEDV的体外培养较为困难,近年来产生了以蛋白为基础的ELISA. Knuchel等<sup>[27]</sup>以制备的PEDV S蛋白和N蛋白为抗原,建立了检测PEDV抗体的ELISA,并发现S-ELISA更为有效,可在感染后更长时间检测出猪体内PEDV抗体. Oh等用建立的间接ELISA方法对48个猪场的1 024份样品进行检测,结果与中和试验(SN)的符合率为84.2%,且该ELISA方法具有比SN高的敏感性和特异性. Hou等<sup>[40]</sup>在大肠杆菌中表达的重组N蛋白建立的ELISA方法,特异性和敏感性分别为98.7%和98.0%,对884份临床样本进行检测,与SN的符合率为88.3%,为PEDV的抗体检测提供了手段. Rodák等<sup>[26]</sup>利用PEDV M蛋白的单克隆抗体建立了敏感性高、特异性高的竞争阻断ELISA诊断方法. Sozzi等<sup>[41]</sup>以单克隆抗体为基础建立的双抗体夹心ELISA方法,对采自不同猪场具有肠炎症状的仔猪粪便样本506份进行检测,并与RT-PCR方法进行比较,结果二者具有很高的相关性,为PEDV的流行病学研究提供了一种有效的方法. Ren等<sup>[42]</sup>将在大肠杆菌中表达的M蛋白纯化后免疫健康家兔,制备抗M蛋白的多克隆抗体,免疫荧光检测分析,制备的抗体可从不同肠炎病毒感染的细胞中检测出PEDV,而且用该抗体建立的间接ELISA方法,不与TGEV、AIBV、PRRSV、CSFV及PRV等反应. 尽管以上研究已经建立了PEDV及其抗体的相关ELISA检测方法,但目前国内尚未有商品化的ELISA试剂盒可用,需要在ELISA检测方

法的特异性、敏感性和稳定性等方面进一步研究.

**2.4 免疫层析法** 胶体金免疫层析试验是将免疫胶体金技术与层析分析技术有机结合起来,建立的一种快速免疫学检测技术. 本法简便、快速,可在几分钟内观察结果,已成为目前最主要的快速免疫分析方法之一,在畜禽疾病诊断疫情监测方面亦具有巨大的发展潜力和应用前景. 张利勃等<sup>[43]</sup>将葡萄球菌蛋白A(staphylococcal protein A, SPA)进行胶体金标记后作为指示介质,将基因工程表达的PEDV M蛋白抗原和自制的抗SPA多抗血清包被硝酸纤维素膜,分别作为检测线和质控线,制成了一种检测PEDV血清抗体的快速诊断试纸. 与ELISA方法相比,二者具有相近的灵敏度. 对75份临床样本的检测结果显示,两种方法的符合率为96%,为PEDV的抗体检测提供了一种快速、简便的方法. 免疫胶体金检测试纸条由于在检测过程中不需要特殊的仪器设备,且操作简单,不需要专门的技术人员,因而该方法在猪场,特别是中小规模的猪场有较好的应用前景.

**2.5 RFLP方法** Song等<sup>[15]</sup>通过RFLP(限制性酶切片段长度多态性分析)技术分析了PEDV的细胞致弱毒株DR13和地方分离毒株的ORF3,发现适应细胞的DR13毒株ORF3序列在HindIII和Xho II限制性酶切位点处发生了变化,该位点的差异,可用于区分PEDV细胞适应株和野毒株,亦可用于PEDV感染的流行病学研究. Lee等<sup>[37]</sup>通过以RT-PCR为基础的RFLP技术分析了13株韩国分离株和疫苗株J-vac及CV777的N蛋白基因,发现其中11个分离株与疫苗株在AspLE I、Hga I和MspR9 I限制性酶切位点有差异. 对N基因进行RFLP分析有望成为区分疫苗株和野毒株的一种有效方法.

### 3 结论

快速、精确的诊断是有效防控疫病的基础和必要条件,在PED的诊断方面近年来取得了很大的进展,已经有越来越多的技术应用于PED的诊断,其中ELISA和RT-PCR法是目前研究的重点,ELISA法有简便、快速、特异性强等优点,但对于抗原的纯度要求较高;PCR诊断技术灵敏度高、特异性强,但受仪器设备的制约,不适于临床推广. 因此,应对已有的各种方法进行深入研究,使他们更趋完善并方便于临床应用. 另一方面,随着PEDV基因组研究的深入,有关蛋白结

#### ■应用要点

PED的诊断方法有多种,对于不同规模的猪场,可采用符合本场条件的方法对本病进行诊断. 有利于PED的防控.



### ■名词解释

限制性酶切片段长度多态性分析(RFLP): 一种区分具有抗原相关性病毒的有效手段, 将抗原性相近的病毒核酸用特定的限制性内切酶进行酶切, 然后对酶切的产物进行分析, 从而达到区分被检病毒核酸的目的。

构和功能不断揭示, 也将为PEDV诊断技术的发展提供强有力的手段。

### 4 参考文献

- Oldham J. Pig Farming. *Health Serv J* 1972; 121: 18 [PMID: 22049626]
- Debouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777. *Am J Vet Res* 1980; 41: 219-223 [PMID: 6245603]
- Kweon CH, Kwon BJ, Jung TS, Kee YJ, Hur DH, Hwang EK, Rhee JC, An SH. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Korea. *Korean J Vet Res* 1993; 33: 249-254
- Takahashi K, Okada K, Ohshima K. An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi* 1983; 45: 829-832 [PMID: 6323804 DOI: 10.1292/jvms1939.45.829]
- Kweon CH, Kwon BJ, Kang YB, An SH. Cell adaptation of KPEDV-9 and serological survey on porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in Korea. *Korean J Vet Res* 1994; 34: 321-326
- Sueyoshi M, Tsuda T, Yamazaki K, Yoshida K, Nakazawa M, Sato K, Minami T, Iwashita K, Watanabe M, Suzuki Y. An immunohistochemical investigation of porcine epidemic diarrhoea. *J Comp Pathol* 1995; 113: 59-67 [PMID: 7490338 DOI: 10.1016/S0021-9975(05)80069-6]
- Puranaveja S, Poolperm P, Lertwatcharasarakul P, Kesdaengsakonwut S, Boonsoongnern A, Urairong K, Kitikoon P, Choojai P, Kedkovid R, Teankum K, Thanawongnuwech R. Chinese-like strain of porcine epidemic diarrhea virus, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1112-1115 [PMID: 19624933 DOI: 10.3201/eid1507.081256]
- 杨群, 何孔旺, 陆承平. 应用多重RT-PCR方法检测158例猪粪样中的两种冠状病毒. *中国预防兽医学报* 2006; 28: 431-435
- 于晓龙. 猪流行性腹泻病毒和猪传染性胃肠炎病毒混合感染的调查. *安徽农学通报* 2007; 13: 156-157
- Li ZL, Zhu L, Ma JY, Zhou QF, Song YH, Sun BL, Chen RA, Xie QM, Bee YZ. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in south China. *Virus Genes* 2012; 45: 181-185 [PMID: 22528639 DOI: 10.1007/s11262-012-0735-8]
- Fan JH, Zuo YZ, Li JH, Pei LH. Heterogeneity in membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in China. *Virus Genes* 2012; 45: 113-117 [PMID: 22585338 DOI: 10.1007/s11262-012-0755-4]
- Chen JF, Sun DB, Wang CB, Shi HY, Cui XC, Liu SW, Qiu HJ, Feng L. Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China. *Virus Genes* 2008; 36: 355-364 [PMID: 18214664 DOI: 10.1007/s11262-007-0196-7]
- Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, Tobler K. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* 2001; 23: 137-144 [PMID: 11724265 DOI: 10.1023/A:1011831902219]
- Park SJ, Moon HJ, Luo Y, Kim HK, Kim EM, Yang JS, Song DS, Kang BK, Lee CS, Park BK. Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses. *Virus Genes* 2008; 36: 95-104 [PMID:

- 17932736 DOI: 10.1007/s11262-007-0164-2]
- Song DS, Yang JS, Oh JS, Han JH, Park BK. Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3. *Vaccine* 2003; 21: 1833-1842 [PMID: 12706667 DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00027-6]
- Sun DB, Feng L, Shi HY, Chen JF, Liu SW, Chen HY, Wang YF. Spike protein region (aa 636789) of porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of neutralizing antibodies. *Acta Virol* 2007; 51: 149-156 [PMID: 18076304]
- Duarte M, Laude H. Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *J Gen Virol* 1994; 75: 1195-1200 [PMID: 8176382 DOI: 10.1099/0022-1317-75-5-1195]
- Chang SH, Bae JL, Kang TJ, Kim J, Chung GH, Lim CW, Laude H, Yang MS, Jang YS. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cells* 2002; 14: 295-299 [PMID: 12442904]
- Cruz DJ, Shin HJ. Application of a focus formation assay for detection and titration of porcine epidemic diarrhea virus. *J Virol Methods* 2007; 145: 56-61 [PMID: 17576016 DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.05.012]
- Sun D, Feng L, Shi H, Chen J, Cui X, Chen H, Liu S, Tong Y, Wang Y, Tong G. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Vet Microbiol* 2008; 131: 73-81 [PMID: 18400422 DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.02.022]
- Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjöström H, Norén O, Laude H. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 1992; 357: 417-420 [PMID: 1350661 DOI: 10.1038/357417a0]
- Li BX, Ge JW, Li YJ. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology* 2007; 365: 166-172 [PMID: 17467767 DOI: 10.1016/j.virol.2007.03.031]
- 孙东波, 陈建飞, 时洪艳, 申识川, 吕茂杰, 范秀萍, 陈洪岩, 冯力. 猪流行性腹泻病毒S蛋白受体结合域的分析. *畜牧兽医学报* 2009; 40: 528-532
- Lee DK, Park CK, Kim SH, Lee C. Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Res* 2010; 149: 175-182 [PMID: 20132850 DOI: 10.1016/j.virusres.2010.01.015]
- Park SJ, Moon HJ, Yang JS, Lee CS, Song DS, Kang BK, Park BK. Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea. *Virus Genes* 2007; 35: 321-332 [PMID: 17436070 DOI: 10.1007/s11262-007-0096-x]
- Rodák L, Valíček L, Smíd B, Nevoránková Z. An ELISA optimized for porcine epidemic diarrhoea virus detection in faeces. *Vet Microbiol* 2005; 105: 9-17 [PMID: 15607079 DOI: 10.1016/j.vetmic.2004.09.020]
- Knuchel M, Ackermann M, Müller HK, Kihm U. An ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) based on the specific solubility of the viral surface glycoprotein. *Vet Microbiol* 1992; 32: 117-134 [PMID: 1441196 DOI: 10.1016/0378-1135(92)90100-8]
- Jinghui F, Yijing L. Cloning and sequence analysis of the M gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03. *Virus Genes* 2005; 30: 69-73 [PMID: 15744564 DOI: 10.1007/s11262-004-4583-z]
- Laude H, Gelfi J, Lavenant L, Charley B. Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect

- induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Virol* 1992; 66: 743-749 [PMID: 1309909]
- 30 Junwei G, Baoxian L, Lijie T, Yijing L. Cloning and sequence analysis of the N gene of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03. *Virus Genes* 2006; 33: 215-219 [PMID: 16972037 DOI: 10.1007/s11262-005-0059-z]
- 31 Kim SY, Song DS, Park BK. Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13: 516-520 [PMID: 11724144 DOI: 10.1177/104063870101300611]
- 32 Ishikawa K, Sekiguchi H, Ogino T, Suzuki S. Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR. *J Virol Methods* 1997; 69: 191-195 [PMID: 9504764 DOI: 10.1016/S0166-0934(97)00157-2]
- 33 Kubota S, Sasaki O, Amimoto K, Okada N, Kitazima T, Yasuhara H. Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid protein genes among strains of the virus. *J Vet Med Sci* 1999; 61: 827-830 [PMID: 10458108 DOI: 10.1292/jvms.61.827]
- 34 Jung K, Chae C. RT-PCR-based dot blot hybridization for the detection and differentiation between porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in fecal samples using a non-radioactive digoxigenin cDNA probe. *J Virol Methods* 2005; 123: 141-146 [PMID: 15620395]
- 35 Kim O, Chae C. Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine epidemic diarrhea virus in pigs. *Can J Vet Res* 2002; 66: 112-116 [PMID: 11989732]
- 36 Song DS, Kang BK, Oh JS, Ha GW, Yang JS, Moon HJ, Jang YS, Park BK. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. *J Vet Diagn Invest* 2006; 18: 278-281 [PMID: 16789718 DOI: 10.1177/104063870601800309]
- 37 Lee C, Park CK, Lyoo YS, Lee du S. Genetic differentiation of the nucleocapsid protein of Korean isolates of porcine epidemic diarrhoea virus by RT-PCR based restriction fragment length polymorphism analysis. *Vet J* 2008; 178: 138-140 [PMID: 17728163 DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.07.007]
- 38 Ben Salem AN, Chupin Sergei A, Bjadovskaya Olga P, Andreeva Olga G, Mahjoub A, Prokhvatilova Larissa B. Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. *J Virol Methods* 2010; 165: 283-293 [PMID: 20170679 DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.02.010]
- 39 Ren X, Li P. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Genes* 2011; 42: 229-235 [PMID: 21286798 DOI: 10.1007/s11262-011-0570-3]
- 40 Hou XL, Yu LY, Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies. *Vet Microbiol* 2007; 123: 86-92 [PMID: 17368968 DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.02.014]
- 41 Sozzi E, Luppi A, Lelli D, Martin AM, Canelli E, Brocchi E, Lavazza A, Cordioli P. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus. *Res Vet Sci* 2010; 88: 166-168 [PMID: 19501378 DOI: 10.1016/j.rvsc.2009.05.009]
- 42 Ren X, Suo S, Jang YS. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection. *Biotechnol Lett* 2011; 33: 215-220 [PMID: 20882317 DOI: 10.1007/s10529-010-0420-8]
- 43 张利勃, 周铁忠, 王坤, 高慎阳. 猪流行性腹泻胶体金抗体检测技术的建立及其应用. *中国农学通报* 2011; 27: 374-377

#### ■同行评价

本文对PEDV的基因结构和功能以及各基因在PED诊断中的作用进行了总结和分析,对PCR和ELISA等方法在PED诊断中的应用进行了阐述,有助于新型诊断方法的建立和PED的快速诊断,应用性较强。

编辑 李军亮 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

#### • 消息 •

### 《世界华人消化杂志》参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang等”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号.如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>.文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

# 轮状病毒感染机制及防治的研究进展

赵高伟, 任晓峰

## ■背景资料

轮状病毒是导致婴幼儿及幼龄动物腹泻重要的人兽共患病原体之一, 危害极为严重。现如今对其的致病机制研究还不够深入, 还未有针对该病原体的特效治疗药物问世, WHO也将轮状病毒疫苗作为优先开发的疫苗项目之一。开发安全、有效的药物以及轮状病毒疫苗迫在眉睫。

赵高伟, 任晓峰, 东北农业大学动物医学学院预防兽医学系 黑龙江省哈尔滨市 150030

赵高伟, 硕士, 主要从事预防兽医学方向的研究。

教育部新世纪优秀人才基金资助项目, No. NCET-10-0144

教育部科技研究重点基金资助项目, No. 212038

教育部高等学校博士学科点专项科研基金(博导类)资助项目, No. 20122325110019

哈尔滨市科技创新人才研究专项基金资助项目(优秀学科带头人), No. RC2012XK002003

作者贡献分布: 此课题的设计及研究指导由任晓峰完成; 论文撰写由赵高伟完成; 审核和修改由任晓峰完成。

通讯作者: 任晓峰, 博士, 教授, 博士生导师, 黑龙江省“龙江学者”奖励计划特聘教授, 150030, 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街59号, 东北农业大学动物医学学院预防兽医学系。

rxfe@mail@yahoo.com.cn; renxf@neau.edu.cn

电话: 0451-55190385

收稿日期: 2012-09-17 修回日期: 2012-12-20

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-08

## Rotavirus infections: mechanisms, prevention and treatment

Gao-Wei Zhao, Xiao-Feng Ren

Gao-Wei Zhao, Xiao-Feng Ren, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China

Supported by: Program for New Century Excellent Talents in University of Ministry of Education of P.R. China, No. NCET-10-0144; the Key Project of Ministry of Education of P.R. China, No. 212038; Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (Ph.D. Student Supervisor Type) of Ministry of Education of P.R. China, No. 20122325110019; Innovation Talent Project (Excellent discipline leader) of the Harbin Science and Technology Bureau, No. RC2012XK002003.

Correspondence to: Xiao-Feng Ren, Professor, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, 59 Mucai Street, Xiangfang District, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China. rxfe@mail@yahoo.com.cn; renxf@neau.edu.cn

Received: 2012-09-17 Revised: 2012-12-20

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-08

## Abstract

Rotavirus is an important gastrointestinal pathogen which can cause severe diarrhea in young animals and infants. Although rotavirus infections are usually latent, large-scale outbreak may occur if environmental factors change or the immune defense of hosts decreases. As rotavirus is a pathogen of zoonotic diseases, studies

on rotavirus infections are of great importance in public health and clinical application. This article provides an overview of the progress in research on viral pathogen, clinical manifestations, as well as drug and vaccine research, with an aim to provide a reference for the prevention and treatment of rotavirus infections.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Rotavirus; Pathogen characteristics; Infection mechanisms; Drugs; Vaccination

Zhao GW, Ren XF. Rotavirus infections: mechanisms, prevention and treatment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 60-65

## 摘要

轮状病毒是引起多种幼龄动物以及婴幼儿腹泻的重要病原体。轮状病毒感染常为隐性, 但环境因素改变或机体免疫力下降则可引起该病的爆发与流行。此外, 轮状病毒也是一种引起人畜共患病的病原体, 对其进行深入研究具有重要的公共卫生学意义。轮状病毒感染机制和防治研究有重要实践价值。本文综述了轮状病毒病原学、临床表现以及药物和疫苗方面的研究进展, 为轮状病毒病防治提供参考。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 轮状病毒; 病原特性; 感染机制; 药物; 疫苗预防

赵高伟, 任晓峰. 轮状病毒感染机制及防治的研究进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21(1): 60-65

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/60.asp>

## 0 引言

1969年, Mebus最早从犊牛中发现轮状病毒, 之后澳大利亚科学家(Bishop)在患有严重腹泻婴儿的胃肠道内也发现了同类病毒<sup>[1]</sup>。Thomas Henry Flewett使用电子显微镜观察该类病毒后, 根据其形态特征建议将其命名为轮状病毒<sup>[2]</sup>。轮状病毒是引起幼儿及各种幼龄动物非细菌型腹

## ■同行评议者

王建国, 副教授, 南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系

■ **研发前沿**  
 微生态制剂作为新型预防轮状病毒感染的药物具有一定的意义。疫苗的预防仍是关键，失去病毒基因组病毒样粒子(VLP)已经被证明具有良好的免疫原性，作为新型的疫苗有其独特的优势。

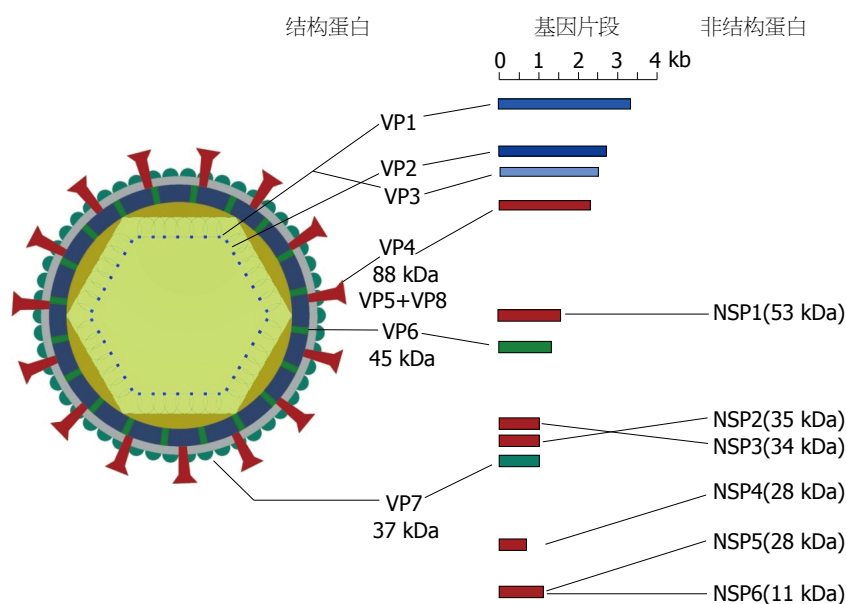


图 1 轮状病毒的结构模式图(基因组片段的大小参考人轮状病毒MC345株)

泻的主要病原体<sup>[3,4]</sup>。该病毒还可以通过人与人之间的接触传播,感染者的粪便或呕吐物中的病毒颗粒如 $>10^{12}$ 个/g,也会是轮状病毒的主要传染源<sup>[5]</sup>。据调查,在撒哈拉以南的非洲和亚洲地区,超过三分之一的婴幼儿腹泻及胃肠炎疾病是由轮状病毒引起的,每年导致50万到60万婴幼儿死亡<sup>[6,7]</sup>。欧洲和美国预防和治疗该类疾病的直接和间接的医疗费用高达数10亿美元<sup>[8]</sup>。轮状病毒在不同地区感染的普遍性表明,提高的生活卫生水平并不能降低轮状病毒的感染率和发病率<sup>[9]</sup>。另外,尽管有一些药物可缓解轮状病毒感染引起的临床症状,但目前还没有治疗轮状病毒感染的特效药物<sup>[10]</sup>。轮状病毒的血清型与疾病的严重性通常无直接相关性,各种轮状病毒的交叉免疫保护免疫机制还不明确<sup>[11]</sup>。因此加强对轮状病毒感染机制的研究,开发安全有效的疫苗对预防轮状病毒感染显得非常重要。

### 1 轮状病毒的病原学特征和血清型

轮状病毒无囊膜,呈二十面体,直径约为70 nm。电子显微镜观察,轮状病毒是带有短纤突且外缘光滑近似轮状的粒子。该病毒粒子由3层蛋白衣壳组成:外层衣壳(VP7和VP4)、中间层衣壳(VP6)和内层衣壳(VP2)(图1)。通常只有包裹3层衣壳蛋白的粒子才具有传染性<sup>[12]</sup>。病毒基因组被内层衣壳、RNA依赖性RNA聚合酶(VP1)及修饰酶(VP3)包裹,并由11个不连续的dsRNA组成,编码6个结构蛋白(VP1-VP4/VP6/VP7)和6个非结构蛋白(NSP1-NSP6),除第11个节段含有两个开放阅读框并编码NSP5和NSP6外,其他每节段分别编码一种蛋白<sup>[13]</sup>。

在宿主体内,不同株轮状病毒的共感染可能会造成11个基因节段发生重配,产生新型的轮状病毒。

轮状病毒编码的位于中间衣壳的VP6蛋白具有高度保守性,常称之为群抗原或诊断抗原,根据其抗原性的不同可以将轮状病毒分为A-G 7个种群,感染人的轮状病毒大多属于A群,进一步可以将轮状病毒分为2个亚群为23个G(G1-G23)血清型(取决于VP7中和抗原)和31个P(P[1]-P[13])血清型(取决于VP4血凝素抗原)<sup>[14]</sup>。G-P组合血清型由病毒的VP7和VP4共同决定,目前,G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]和G9P[8] 5种血清型的轮状病毒是危害人类健康最为重要的毒株<sup>[15]</sup>,其中G1P[8]和G3P[8]型在我国最为常见。

### 2 轮状病毒感染机制与临床表现

轮状病毒感染性疾病多发于秋冬季节,引起婴幼儿及幼龄动物严重的胃肠炎、腹泻、脱水、电解质紊乱、休克甚至死亡。病理剖检常见肠绒毛变短,胃内有未消化的乳汁等。有报道指出轮状病毒感染小肠上皮细胞后,能够通过胃肠屏障进入血液,进而对其他内脏造成损伤<sup>[16,17]</sup>。轮状病毒的融合素蛋白VP4在肠道胰液的作用下裂解为带氨基末端的VP8和带羧基末端的VP5,这两个片段在病毒入侵宿主细胞的初期起着重要的作用。轮状病毒感染肠道上皮细胞后,所编码的非结构蛋白NSP4糖基化使宿主细胞膜对钙离子的通透性增加,胞内钙离子水平升高,氯离子的分泌增加<sup>[18]</sup>。加之NSP3能够阻止宿主细胞蛋白质的合成,加重肠道内水电解质的失衡,导致分泌性腹泻的发生<sup>[19]</sup>。近来研究结果表明轮状病毒感染的

### ■ 相关报道

张振等证明了微生态制剂鼠李糖乳杆菌以及嗜酸乳杆菌对感染轮状病毒的乳鼠空肠黏膜上皮细胞有一定的保护作用。Crawford等证明非复制型载体病毒样粒子(VLPs)携带VP2/6(双离子型)或VP2/6/7(三离子型)已经被证实具有免疫原性。

表 1 临床上常用的治疗轮状病毒腹泻的疾病的药物

药物名称	药用成分的性质	作用机理
喜炎平, 炎琥宁	穿心莲提取物	改善局部毛细血管循环, 提高抗原递呈细胞的吞噬能力
消旋卡多曲	脑啡肽抑制剂	保护内源性脑啡肽免受降解, 降低c-AMP在肠黏膜的水平
百贝宁	抗轮状病毒鸡卵黄免疫球蛋白(IgG)	特异性地中和轮状病毒, 激活补体系统
运德素	注射用重组人干扰素 $\alpha$ 1b	诱导宿主细胞产生抗病毒蛋白, 干扰病毒的复制, 增强机体T细胞、B细胞功能, 活化NK细胞、巨噬细胞
枯草杆菌二联活菌颗粒	微生态制剂	维持肠道菌群的平衡, 促进肠道上皮细胞的修复, 提供菌酶抵制病毒入侵, 补充维生素

前几个小时内, 病毒NSP1可通过体内各种调节途径抑制感染细胞的过早凋亡, 有助于逃避抗原递呈细胞的识别, 进而促进病毒增殖<sup>[20]</sup>。Barro等<sup>[21]</sup>的研究表明轮状病毒NSP1能够通过各种途径阻止干扰素的生成, 导致干扰素及相关细胞因子介导的炎症反应受阻, 使宿主抗轮状病毒感染能力下降。轮状病毒各基因所编码的蛋白都与胃肠炎的发生有着一定的相关性, 且在病毒感染的病毒血症期, 人与动物的发病机制几乎相同<sup>[22]</sup>。

### 3 轮状病毒感染的防治

**3.1 抗轮状病毒感染药物研究进展** 尽管目前还没有针对轮状病毒的特效药物, 但在药物抗轮状病毒感染方面的研究还是取得了一定的进展。近来的报道指出, 微生态制剂鼠李糖乳杆菌以及嗜酸乳杆菌对感染轮状病毒的乳鼠空肠黏膜上皮细胞有一定的保护作用, 并且在感染前灌服的保护效果要好于感染后灌服, 这对于预防轮状病毒感染具有一定的意义<sup>[23,24]</sup>。激素活性形式的25-羟基维生素D3能够提高机体内抗体水平并促进抗炎细胞因子的生成, 进而可以提高机体抵抗轮状病毒感染的能力<sup>[25]</sup>。中药治疗轮状病毒感染也有一定的效果。由黄芪、党参所制成参芪扶正注射液在小鼠体内能够抑制轮状病毒的复制<sup>[26]</sup>。马蹄香提取物一方面通过激活CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>细胞, 增加抗体的分泌; 另一方面, 调节CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值, 抑制CD19<sup>+</sup>水平的升高, 调节一些细胞因子的释放, 从而改善机体免疫功能<sup>[27]</sup>。白头翁素通过减少肠道黏膜损伤加速肠道黏膜修复从而减弱轮状病毒致病性<sup>[28]</sup>。但上述药物的应用效果主要来自动物实验, 如其效果和安全性在人体实验中得到验证, 将会对临床用药提供一定的参考。有报道指出感染轮状病毒后幼儿血清内的锌含量会降低, 在常规的治疗基础上补充葡萄糖酸锌可以提高疗效<sup>[29]</sup>。比较而言, 西药的药用成分单一, 抗病毒作用机制明确, 但是对于幼儿的肝功能、肾功能的损害较大; 中药制剂的不良反应较

小, 但是抗病毒的机制较为复杂。微生态制剂作为一种新型预防性药物具有优越性, 但是相关的一些技术指标如定植特性和稳定性等方面还有待进一步的完善。目前临床上部分常用抗轮状病毒腹泻的药物性质及其作用机制见表1。

**3.2 轮状病毒疫苗的研究进展** 预防接种是从根本上控制轮状病毒的传播和流行的有效手段。临床研究发现, 婴幼儿再次感染轮状病毒后表现的临床症状的严重性要远低于初次感染, 并且两次感染轮状病毒后, 几乎不会再发生轮状病毒所引起的腹泻, 这一现象表明重复抗原刺激可诱导长久性的免疫保护<sup>[30,31]</sup>, 证明开发和应用疫苗预防轮状病毒感染是有效和可行的。

**3.2.1 单价及重组弱毒疫苗:** 1984年Vesikari报道利用轮状病毒RIT 4237株制备的首个口服轮状病毒活疫苗对儿童能够起到针对轮状病毒保护作用。但后来证明该疫苗并不能对异型血清型的轮状病毒起到免疫保护的作用, 同时在一些发展中国家应用后, 并没有起到很好的免疫保护效果, 现已停止对该疫苗的进一步研究<sup>[32,33]</sup>。后来由美国国立卫生研究院Kapikian等研制的G3型恒河猴轮状病毒MMV18006疫苗株及美国费城Wister研究所和法国Meneux研究所联合研制的G6型牛轮状病毒WC3疫苗株, 在不同国家和地区免疫保护效果相差很大, 且病毒的排出率也较高, 相应研究也先后终止<sup>[34]</sup>。这些证据表明单价疫苗不能起到有效的免疫保护, 不同血清型轮状病毒间的交叉免疫保护效果较差, 有必要开发能预防多种血清型轮状病毒感染的包括多价重配疫苗在内的新型疫苗。多价重配疫苗是指轮状病毒在自然状态下或人为地使轮状病毒RNA重新组合, 进而使重组的病毒株失去反应原性而保留免疫原性。1998年美国正式批准了一种由人-恒河猴轮状病毒重配的四价疫苗(Rota shield)上市, 虽然该疫苗在各地区的保护率达50%以上, 但是后来流行病学协会发现他能增加部分儿童出现肠套叠的机率, 于是Rota shield上市一年后后被停用<sup>[35]</sup>。

目前为大多数国家所认可的轮状病毒疫苗分别是由比利时GlaxoSmithKline公司研制的人源轮状病毒单价疫苗(Rotarix)以及由美国Merck公司研制的人-牛轮状病毒重配活疫苗(Rotateq)。他们已经通过III期临床试验, 并证明了该两种疫苗不会增加儿童肠套叠发生的机率, 对重症腹泻的保护率都达到80%以上<sup>[36-39]</sup>。虽然这两类疫苗现都已经被猪环状病毒(porcine circovirus, PCV)污染, 但由于PCV对人无致病性以及这两类疫苗存在极大的社会效益, 因此这两种疫苗仍在市场上使用<sup>[40-42]</sup>。我国学者研究指出, 部分儿童服用Rotarix后排毒率超过50%, 并且该疫苗没有对免疫缺陷的患者进行安全评估<sup>[43]</sup>。另外由于这两类疫苗价格昂贵, 因此许多发展中国家倾向于利用当地分离的弱毒株开发疫苗<sup>[44]</sup>。这两类疫苗目前还没有在我国获得批准上市。

在国内, 单价羔羊P[12]G10血清型轮状病毒疫苗LLR由兰州生物制品研究所研制成功并于2000年获得中国药品监督管理局正式批准<sup>[45]</sup>。小范围的应用表明该疫苗的保护率可达70%, 并且有良好的安全性。G2型轮状病毒基因重配株LD9已经重组构建完成, 并且该疫苗候选株可以在vero细胞系(vero细胞是WHO推荐的生产人用疫苗细胞系)上获得高表达量以及稳定传代培养, 但是该重组的疫苗候选株还处于实验室研究阶段<sup>[46]</sup>。叶丽萍等<sup>[47]</sup>成功构建了猪A组轮状病毒PW425et-VP4基因工程乳酸菌, 其表达的蛋白具有与猪轮状病毒多克隆抗体的反应原性, 为开放微生态制剂疫苗提供了一定的参考。

**3.2.2 转基因植物口服疫苗:** 实验表明转基因植物生产的疫苗可以诱导机体产生特异性和非特异性的免疫应答<sup>[48]</sup>。Matsumura等<sup>[49]</sup>成功地将A组牛轮状病毒的VP6基因转移到马铃薯中, 并在花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子控制下, 表达了VP6蛋白, 经浓缩后免疫小鼠可在其体内检测到抗VP6蛋白抗体。Chung等<sup>[50]</sup>将牛轮状病毒INDVP6插入到植物表达载体pLTAP357构成重组质粒, 通过三亲杂交的方法将VP6基因导入到悬浮培养的番茄细胞中并成功表达了VP6抗原。Yu等<sup>[51]</sup>用转VP6基因马铃薯组织块饲喂小鼠后发现能够提高小鼠血清中特异性IgG抗体和肠内IgA抗体的滴度。轮状病毒VP6蛋白在植物体内成功得以表达并具有一定的免疫原性, 极大降低了轮状病毒诊断试剂的生产成本, 也为开发口服食用型轮状病毒疫苗开辟了新的思路。费蕾等<sup>[52,53]</sup>也分别利用转基因技术将人源轮状病毒和鼠源的VP7蛋白基因导入到马铃薯内并

成功得以表达。Wu等<sup>[54]</sup>研究发现, 小鼠食用表达VP7蛋白转基因马铃薯后可以在黏膜中检测到高滴度的能够中和轮状病毒的IgA抗体。Kim等<sup>[55]</sup>将鼠源轮状病毒非结构蛋白NSP4基因和霍乱肠毒素基因在马铃薯体内共表达获得了轮状病毒NSP4蛋白和霍乱毒素B亚基蛋白的低聚体, 实验证明他们具有相应的生物活性, 抗原与免疫增强剂在植物体内的共表达为提高黏膜免疫反应提供了可能。21世纪以来, 植物性疫苗引起了人们广泛的关注, 也得到了飞速发展。虽然还存在目的蛋白在植物体内表达量低、表达不稳定、选择可以生食植物作为受体植物以及在胃肠道内被消化等瓶颈问题, 但科学家正在筛选和优化转基因植物目的蛋白的启动子、增强子以及密码子以增加目的蛋白的表达量, 并通过在目的基因中添加一些修饰基因以避免其在发挥免疫作用前被消化。相信不久的将来安全可靠且价格廉价的植物性疫苗会被开发出来, 并在预防轮状病毒感染方面起到重要作用。

**3.2.3 亚单位疫苗:** 1986年Streckert等<sup>[56]</sup>合成了轮状病毒外壳蛋白VP7上的一段氨基酸序列SAAF-YRV并接种小鼠, 发现小鼠获得了一定的免疫保护, 这为开发新型轮状病毒抗原肽疫苗提供了参考。将轮状病毒RF株VP2蛋白基因与猴轮状病毒SA11株VP4、VP6和VP7蛋白基因重组到杆状病毒并同时感染昆虫细胞, 发现昆虫细胞内能够产生VP6/7、VP2/6/7和VP2/4/6 3种自我装配的病毒样粒子; 注射免疫小鼠和家兔后, 均能诱导产生特异中和抗体, 能阻止同血清型病毒的侵袭<sup>[57]</sup>。非复制型载体病毒样粒子(VLPS)携带VP2/6(双离子型)或VP2/6/7(三离子型)已经被证实具有免疫原性<sup>[8]</sup>。有证据表明轮状病毒VP2/6双离子型病毒样粒子已经可以与减毒疫苗联合使用<sup>[58]</sup>。张群等<sup>[59]</sup>将人轮状病毒VP2、VP6、VP4(P8血清型)和VP7(G1血清型)重组到巴斯德毕赤酵母并成功构建了能够表达相应蛋白的轮状病毒3层病毒样粒子(virus-like particles, VLP)并用透射电镜观察到了病毒样粒子。这些结果为开发轮状VLP候选疫苗奠定了基础。另有报道指出给动物肌肉注射轮状病毒灭活苗后动物机体可产生针对通过黏膜途径侵入的轮状病毒免疫保护效应<sup>[60]</sup>, 为开发非口服型轮状病毒疫苗提供了理论依据。

## 4 结论

尽管目前在预防和治疗轮状病毒感染相关疾病方面已经取得了显著进展, 但对轮状病毒的致病机制以及机体免疫保护机制方面的研究还不

## ■创新盘点

本文提出预防轮状病毒时建议对同一地区的人和动物同时免疫, 并且尽量利用当地分离疫苗株制备, 甄别针对不同轮状病毒血清型疫苗, 以提高疫苗免疫保护效果。

### 同行评价

本文搜集了近几年国内外关于轮状病毒感染机制及防治的研究进展,并加以总结,为读者获取相关资料提供了捷径。

够完善,在一定程度上限制了安全、有效、廉价、易于生产和保存的轮状病毒疫苗的开发。随着科学理论的发展和新技术的出现,植物性疫苗、病毒样粒子以及传统的重组轮状病毒候选疫苗将会被不断地开发与改进。由于轮状病毒在人和动物之间以及动物与动物之间可以相互传播,且不同血清型的轮状病毒同时感染动物时可产生新的重组毒株,因此预防轮状病毒时建议对同一地区的人和动物同时免疫,并且尽量利用当地分离疫苗株制备,甄别针对不同轮状病毒血清型疫苗,以提高疫苗免疫保护效果。

### 5 参考文献

- Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973; 2: 1281-1283 [PMID: 4127639 DOI: 10.1016/S0140-6736(73)92867-5]
- 陈元鼎, 范耀春, 李传印. 轮状病毒分类与命名. *国际病毒学杂志* 2009; 16: 115-120
- De Grazia S, Ramirez S, Giammanco GM, Colomba C, Martella V, Lo Biundo C, Mazzola R, Arista S. Diversity of human rotaviruses detected in Sicily, Italy, over a 5-year period (2001-2005). *Arch Virol* 2007; 152: 833-837 [PMID: 17160368 DOI: 10.1007/s00705-006-0874-0]
- 黄小波, 徐璐, 曹三杰, 文心田. 猪轮状病毒OSU株的培养特性与致病性研究. *中国人兽共患病学报* 2012; 28: 120-123
- World Health Organization. Rotavirus vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2007; 82: 285-295 [PMID: 17691162]
- Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 304-306 [PMID: 16494759 DOI: 10.3201/eid1202.050006]
- Parashar UD, Burton A, Lanata C, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Steele D, Birmingham M, Glass RI. Global mortality associated with rotavirus disease among children in 2004. *J Infect Dis* 2009; 200 Suppl 1: S9-S15 [PMID: 19817620 DOI: 10.1086/605025]
- Desselberger U, Huppertz HI. Immune responses to rotavirus infection and vaccination and associated correlates of protection. *J Infect Dis* 2011; 203: 188-195 [PMID: 21288818 DOI: 10.1093/infdis/jiq031]
- American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. Prevention of rotavirus disease: guidelines for use of rotavirus vaccine. *Pediatrics* 2007; 119: 171-182 [PMID: 17200286 DOI: 10.1542/peds.2006-3134]
- 李肖锋, 国泰. 口服轮状病毒减毒活疫苗Rotarix的现状与研究进展. *中国生物制品杂志* 2011; 24: 491-493
- 严有望, 李少安. WHO关于轮状病毒疫苗的意见书. *国际生物制品杂志* 2010; 6: 321-324
- Estes MK, Kang G, Zeng CQ, Crawford SE, Ciarlet M. Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis. *Novartis Found Symp* 2001; 238: 82-96; discussion 96-100 [PMID: 11444037 DOI: 10.1002/0470846534.ch6]
- Nakagomi T, Nakagomi O. A critical review on a globally-licensed, live, orally-administrable, monovalent human rotavirus vaccine: Rotarix. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9: 1073-1086 [PMID: 19591630 DOI: 10.1517/14712590903103787]
- Matthijnsens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals

- a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 2008; 82: 3204-3219 [PMID: 18216098 DOI: 10.1128/JVI.02257-07]
- Dennehy PH. Rotavirus vaccines--an update. *Vaccine* 2007; 25: 3137-3141 [PMID: 17321017 DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.01.102]
  - 蔡小明, 周峰. 婴幼儿轮状病毒性肠炎肠外表现临床分析. *临床合理用药* 2012; 5: 101
  - 韩粉香. 婴幼儿轮状病毒性肠炎临床诊治分析. *河北医药* 2011; 33: 234-235
  - Díaz Y, Chemello ME, Peña F, Aristimuño OC, Zambrano JL, Rojas H, Bartoli F, Salazar L, Chwetzoff S, Sapin C, Trugnan G, Michelangeli F, Ruiz MC. Expression of nonstructural rotavirus protein NSP4 mimics Ca<sup>2+</sup> homeostasis changes induced by rotavirus infection in cultured cells. *J Virol* 2008; 82: 11331-11343 [PMID: 18787006 DOI: 10.1128/JVI.00577-08]
  - Montero H, Arias CF, Lopez S. Rotavirus Nonstructural Protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. *J Virol* 2006; 80: 9031-9038 [PMID: 16940515]
  - Bagchi P, Dutta D, Chattopadhyay S, Mukherjee A, Halder UC, Sarkar S, Kobayashi N, Komoto S, Taniguchi K, Chawla-Sarkar M. Rotavirus nonstructural protein 1 suppresses virus-induced cellular apoptosis to facilitate viral growth by activating the cell survival pathways during early stages of infection. *J Virol* 2010; 84: 6834-6845 [PMID: 20392855 DOI: 10.1128/JVI.00225-10]
  - Barro M, Patton JT. Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J Virol* 2007; 81: 4473-4481 [PMID: 17301153 DOI: 10.1128/JVI.02498-06]
  - Blutt SE, Matson DO, Crawford SE, Staat MA, Azimi P, Bennett BL, Piedra PA, Conner ME. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. *PLoS Med* 2007; 4: e121 [PMID: 17439294 DOI: 10.1371/journal.pmed.0040121]
  - 张振, 王晓梅, 汤建桥, 高原, 王宝香, 郑义. 鼠李糖乳杆菌对感染人轮状病毒乳鼠空肠黏膜上皮细胞的保护作用. *华中科技大学学报* 2012; 41: 67-71
  - 高原, 张振, 王宝香, 鲍连生, 彭罕鸣. 嗜酸乳杆菌对感染人轮状病毒乳鼠肠黏膜的保护作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 2963-2969
  - 廖波, 张克英, 丁雪梅, 徐志文, 白世平. 饲料添加25-羟基维生素D3对轮状病毒攻毒和未攻毒断奶仔猪血清和肠内容物抗体和细胞因子水平的影响. *动物营养学报* 2011; 23: 34-42
  - 李文英, 傅万海, 陈国新, 梁剑. 参芪扶正注射液对轮状病毒感染性肠炎小鼠血清IL-2、INF- $\gamma$ 的影响. *海南医学* 2010; 21: 29-31
  - 张佩红, 陈啸洪, 王燕, 李华俊, 章杭湖. 马蹄香治疗婴幼儿轮状病毒肠炎作用机制的初步探讨. *中国全科医学* 2010; 13: 610-612
  - 徐倩倩, 马利芹, 张晓利, 王丽叶, 霍晓青, 褚军, 薛晓阳, 陈立功, 秦建华, 董世山. 白头翁素对PRV、E.coli混合感染性腹泻肠道超微结构的影响. *中国农学通报* 2010; 26: 13-17
  - 谢基灵, 黄小泰. 轮状病毒肠炎患儿血清锌水平及补锌治疗的意义. *儿科药理学杂志* 2010; 16: 18-20
  - Offit PA, Hoffenberg EJ, Santos N, Gouvea V. Rotavirus-specific humoral and cellular immune response after primary, symptomatic infection. *J Infect Dis* 1993; 167: 1436-1440 [PMID: 8388906 DOI: 10.1093/infdis/167.6.1436]
  - Velázquez FR, Matson DO, Calva JJ, Guerrero L, Morrow AL, Carter-Campbell S, Glass RI, Estes MK, Pickering LK, Ruiz-Palacios GM. Rotavirus infections in infants as protection against subsequent infections. *N*

- Engl J Med* 1996; 335: 1022-1028 [PMID: 8793926 DOI: 10.1056/NEJM199610033351404]
- 32 Vesikari T, Isolauri E, D'Hondt E, Delem A, André FE, Zissis G. Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet* 1984; 1: 977-981 [PMID: 6143964 DOI: 10.1016/S0140-6736(84)92323-7]
- 33 宋玲玲, 王延东, 宋玲玲, 王延东, 王洪梅, 武建明, 刘晓, 高运东, 仲跻峰, 何洪彬. 轮状病毒疫苗的研究进展. *家畜生态学报* 2011; 32: 98-101
- 34 Perez-Schael I, Garcia D, Gonzalez M, Gonzalez R, Daoud N, Perez M, Cunto W, Kapikian AZ, Flores J. Prospective study of diarrheal diseases in Venezuelan children to evaluate the efficacy of rhesus rotavirus vaccine. *J Med Virol* 1990; 30: 219-229 [PMID: 2160516 DOI: 10.1002/jmv.1890300315]
- 35 From the Centers for Disease Control and Prevention. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine-United States, 1998-1999. *JAMA* 1999; 282: 520-521 [PMID: 10450702 DOI: 10.1001/jama.282.6.520]
- 36 Richardson V, Hernandez-Pichardo J, Quintanar-Solares M, Esparza-Aguilar M, Johnson B, Gomez-Altamirano CM, Parashar U, Patel M. Effect of rotavirus vaccination on death from childhood diarrhea in Mexico. *N Engl J Med* 2010; 362: 299-305 [PMID: 20107215 DOI: 10.1056/NEJMoa0905211]
- 37 Goveia MG, Rodriguez ZM, Dallas MJ, Itzler RF, Boslego JW, Heaton PM, DiNubile MJ. Safety and efficacy of the pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine in healthy premature infants. *Pediatr Infect Dis J* 2007; 26: 1099-1104 [PMID: 18043445 DOI: 10.1097/INF.0b013e31814521cb]
- 38 Buttery JP, Lambert SB, Grimwood K, Nissen MD, Field EJ, Macartney KK, Akikusa JD, Kelly JJ, Kirkwood CD. Reduction in rotavirus-associated acute gastroenteritis following introduction of rotavirus vaccine into Australia's National Childhood vaccine schedule. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: S25-S29 [PMID: 21183837 DOI: 10.1097/INF.0b013e3181f8fdee]
- 39 Tate JE, Mutuc JD, Panozzo CA, Payne DC, Cortese MM, Cortes JE, Yen C, Esposito DH, Lopman BA, Patel MM, Parashar UD. Sustained decline in rotavirus detections in the United States following the introduction of rotavirus vaccine in 2006. *Pediatr Infect Dis J* 2011; 30: S30-S34 [PMID: 21183838 DOI: 10.1097/INF.0b013e3181ffe3eb]
- 40 McClenahan SD, Krause PR, Uhlentaut C. Molecular and infectivity studies of porcine circovirus in vaccines. *Vaccine* 2011; 29: 4745-4753 [PMID: 21569811 DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.04.087]
- 41 Victoria JG, Wang C, Jones MS, Jaing C, McLoughlin K, Gardner S, Delwart EL. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus. *J Virol* 2010; 84: 6033-6040 [PMID: 20375174 DOI: 10.1128/JVI.02690-09]
- 42 Willoughby RE. Use of Rotarix temporarily suspended, no health risks seen. *AAP News* 2010; 10: 1542
- 43 鞠月迎. 新型轮状病毒疫苗研究进展. *世界临床药物* 2006; 27: 338-343
- 44 江保明, 杨晓明, 徐德启. 轮状病毒疫苗的现状和发展动向. *中国生物制品学杂志* 2012; 25: 251-253
- 45 Fu C, Wang M, Liang J, He T, Wang D, Xu J. Effectiveness of Lanzhou lamb rotavirus vaccine against rotavirus gastroenteritis requiring hospitalization: a matched case-control study. *Vaccine* 2007; 25: 8756-8761 [PMID: 18023510 DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.10.036]
- 46 寇桂英, 胡广宏, 包红, 王名强, 陈汉泉, 汪洲, 周旭. 轮状病毒基因重配株LD9(G2型)vero细胞适应株的选育及其生物学特性. *中国生物制品学杂志* 2011; 23: 857-860
- 47 叶丽萍, 王春玲, 王春风. 猪A组轮状病毒PW425et-vp4基因工程乳酸菌的构建及表达. *中国兽医杂志* 2012; 48: 3-6
- 48 Tacket CO, Mason HS. A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes Infect* 1999; 1: 777-783 [PMID: 10816083 DOI: 10.1016/S1286-4579(99)80080-X]
- 49 Matsumura T, Itchoda N, Tsunemitsu H. Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. *Arch Virol* 2002; 147: 1263-1270 [PMID: 12111435 DOI: 10.1007/s00705-002-0808-4]
- 50 Chung IS, Kim CH, Kim K Il, Hong S H, Park J H, Kim J K, Kim W Y. Production of recombinant rotavirus VP6 from a suspension culture of transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cells. *Biotechnology Letters* 2000; 22: 251-255 [DOI: 10.1023/A:1005626000329]
- 51 Yu J, Langridge W. Expression of rotavirus capsid protein VP6 in transgenic potato and its oral immunogenicity in mice. *Transgenic Res* 2003; 12: 163-169 [PMID: 12739884 DOI: 10.1023/A:1022912130286]
- 52 李晋涛, 吴玉章, 费蕾, 邹丽云, 唐艳, 牟芝蓉, 耿淼. 人源轮状病毒vP7基因的克隆与转基因植物研究. *免疫学杂志* 2003; 19: 11-14
- 53 费蕾, 李晋涛, 吴玉章. 鼠源轮状病毒vP7基因的表达载体构建及转基因植物的研究. *免疫学杂志* 2003; 19: 93-96
- 54 Wu YZ, Li JI, Mou ZR, Fei L, Ni B, Geng M, Jia ZC, Zhou W, Zou LY, Tang Y. Oral immunization with rotavirus VP7 expressed in transgenic potatoes induced high titers of mucosal neutralizing IgA. *Virology* 2003; 313: 337-342 [PMID: 12954202 DOI: 10.1016/S0042-6822(03)00280-0]
- 55 Kim TG, Langridge WH. Assembly of cholera toxin B subunit full-length rotavirus NSP4 fusion protein oligomers in transgenic potato. *Plant Cell Rep* 2003; 21: 884-890 [PMID: 12789506]
- 56 Streckert HJ, Grunert B, Werchau H. Antibodies specific for the carboxy-terminal region of the major surface glycoprotein of simian rotavirus (SA11) and human rotavirus (Wa). *J Cell Biochem* 1986; 30: 41-49 [PMID: 3007546 DOI: 10.1002/jcb.240300106]
- 57 Conner ME, Zarley CD, Hu B, Parsons S, Drabinski D, Greiner S, Smith R, Jiang B, Corsaro B, Barniak V, Madore HP, Crawford S, Estes MK. Virus-like particles as a rotavirus subunit vaccine. *J Infect Dis* 1996; 174 Suppl 1: S88-S92 [PMID: 8752296]
- 58 Crawford SE, Estes MK, Ciarlet M, Barone C, O'Neal CM, Cohen J, Conner ME. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *J Virol* 1999; 73: 4813-4822 [PMID: 10233942]
- 59 张群, 楼觉人. 表达轮状病毒类病毒颗粒的重组毕赤酵母的制备及鉴定. *中国生物制品学杂志* 2011; 7: 818-823
- 60 Wang Y, Azevedo M, Saif LJ, Gentsch JR, Glass RI, Jiang B. Inactivated rotavirus vaccine induces protective immunity in gnotobiotic piglets. *Vaccine* 2010; 28: 5432-5436 [PMID: 20558244 DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.006]

编辑 李军亮 电编 闫晋利





# 猪细小病毒的致病机制与防控策略

仇铮, 任晓峰, 崔尚金

## ■背景资料

猪细小病毒病 (PPV) 是由猪细小病毒引起的一种繁殖障碍疾病, 同时与猪渗出性皮炎、断奶仔猪多系统衰弱综合征等疾病有关, 对妊娠母猪与仔猪具有极大的威胁, 给养殖业造成了巨大的经济损失。目前能有效预防猪细小病毒还没有其他方法, 只能通过使用疫苗进行免疫预防。

仇铮, 崔尚金, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室/猪传染病研究室 黑龙江省哈尔滨市 150001  
任晓峰, 东北农业大学动物医学学院预防兽医系 黑龙江省哈尔滨市 150030

仇铮, 博士, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所助理研究员, 主要从事动物传染病学与免疫学的研究。

崔尚金, 博士, 研究员, 研究生导师, 主要从事动物疫病快速诊断、流行病学、猪细小病毒致病性及基因工程亚单位疫苗的研发。中国农业科学院兽医生物技术国家重点实验室开放课题基金资助项目, No. SKLVBF201103

作者贡献分布: 仇铮与崔尚金撰写文章; 任晓峰负责审核。

通讯作者: 崔尚金, 研究员, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区马端街427号, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室/猪传染病研究室。cuishangjin@hotmail.com

收稿日期: 2012-09-17 修回日期: 2012-12-30

接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-08

## Porcine parvovirus: Pathogenic mechanisms and preventive and control strategies

Zheng Qiu, Xiao-Feng Ren, Shang-Jin Cui

Zheng Qiu, Shang-Jin Cui, Division of Swine Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Xiao-Feng Ren, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China

Supported by: Open Project of the State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, No. SKLVBF201103

Correspondence to: Shang-Jin Cui, Division of Swine Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. cuishangjin@hotmail.com

Received: 2012-09-17 Revised: 2012-12-30

Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-08

## Abstract

Porcine parvovirus, classified in the genus Parvovirus of the family Parvoviridae, is a major cause of reproductive failure in gilts and skin inflammation and inflammatory diarrhea in piglets. The disease caused by porcine parvovirus varies in clinical manifestations and pathological characteristics. In recent years, mixed infection by PPV and other viruses is common, and PPV is one of pathogens that cause many disease syndromes. In this paper, we review the pathogenic mechanisms of PPV and preventive and control strategies for the disease caused by PPV.

## ■同行评议者

喻荣彬, 教授, 南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Porcine parvovirus; Pathogenic mechanisms

Qiu Z, Ren XF, Cui SJ. Porcine parvovirus: Pathogenic mechanisms and preventive and control strategies. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 66-70

## 摘要

猪细小病毒 (porcine parvovirus, PPV) 是细小病毒科细小病毒属的成员, 引起初孕母猪的繁殖障碍、仔猪的皮肤炎症和肠炎性腹泻。这些疾病在临床表现和病理特点上各不相同。近年来, PPV 与其他病毒混合感染发生较多, 是导致很多疾病综合征的病原之一。本文主要针对猪细小病毒的病原、致病机制和防控策略做一综述, 以期对动物细小病毒病的防治提供的借鉴。

© 2013 年版权归 Baishideng 所有。

关键词: 猪细小病毒; 致病机制

仇铮, 任晓峰, 崔尚金. 猪细小病毒的致病机制与防控策略. 世界华人消化杂志 2013; 21(1): 66-70

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/66.asp>

## 0 引言

我国是农业大国, 猪是我国畜牧业的传统养殖对象, 猪肉也是我国城乡居民的主要副食品, 然而近年来猪传染病的流行给我国猪肉的质量和数量都造成了威胁, 因而正确的认识和预防猪病是现在养殖业的工作重点之一。猪细小病毒 (porcine parvovirus, PPV) 导致猪的繁殖障碍疾病、断奶仔猪多系统衰弱综合征和肠炎性腹泻等疾病有关, 对妊娠母猪与仔猪具有极大的威胁, 常给养殖业造成巨大的经济损失。

## 1 病原学

PPV 属于细小病毒科细小病毒属<sup>[1,2]</sup>, 呈圆形或六角形, 二十面体对称, 无囊膜, 直径约为 22-25 nm, 分子量约为  $1.4 \times 10^6$ 。大部分不同物种来源 PPV

表 1 猪细小病毒的生物型分类

生物型	代表株	生物学特性
弱毒株	NADL-2	可作为弱毒疫苗
强毒株	NADL-8	与母猪繁殖障碍相关
皮炎型	kresse	与皮肤损伤, 皮炎发生相关
肠炎型		与肠道病变和拉稀相关
呼吸道型		与PMWS和PRDC疾病相关

毒力由上至下依次增强。PMWS: 猪断奶后多系统衰竭综合征; PRDC: 猪呼吸疾病综合征。

的细小病毒耐热能力极强, 对脂、酶溶剂及有机溶剂抵抗力强, 耐酸范围大, 病毒感染力在pH值3.0-10.0范围内无明显的改变。PPV具有血凝性, 能凝集人、猴、豚鼠、小鼠和鸡的红细胞, 对豚鼠红细胞血凝效果最好, 因此临床上常利用这一特性检测PPV的存在<sup>[3,4]</sup>。PPV几乎能在所有的猪原代细胞(如猪肾、猪睾丸细胞)和传代猪细胞系(如PK15、ST、IBRS2等细胞)中生长, 甚至能在牛肾原代细胞及人的某些传代细胞中增殖<sup>[5]</sup>。

目前PPV只有一个血清型, 但按照PPV的致病性与组织嗜性可将其分为多个不同的类型(表1), 包括非致病性毒株(KBSH、NADL-2)、对免疫不完全胎儿致病并能导致胎儿死亡的毒株(如NADL-8、IAF-76)、对免疫不完全胎儿致病并能引起皮炎的毒株(高致病性, 如Kresse、IAF-A54)、肠炎型毒株和呼吸道型毒株(参与PRDC)。

## 2 流行病学

PPV感染普遍存在于世界各地的猪群中, 该病暴发季节主要是春季产仔的季节。1966年, Mayr进行猪瘟病毒组织培养时发现了PPV。Cartwright和Huck于1967年首次在英国猪流产胎儿的脏器中分离出猪细小病毒以来, 现已在比利时(1967)、德国(1968)、美国(1972)、日本(1972)、荷兰(1972)、澳大利亚(1973)、芬兰(1979)、法国(1977)和加拿大(1978)等国都有相继的报道<sup>[6]</sup>。在我国猪细小病毒发现较晚, 但是流行情况却相当普遍, 1982年中国首次分离到PPV, 随后相继在上海、四川、广西、黑龙江、天津和湖北等地分离到PPV, 这表明PPV成全国性分布<sup>[7,8]</sup>。随着PPV疫苗的投入使用, 起初疫情得到了很好的控制, 于90年代中期开始, 猪群的发病率显著下降。但2005年以来, 国内多个省份陆续对PPV阳性

感染率进行了调查, 结果显示全国范围内猪群的阳性感染率较高, 有爆发PPV的可能性, 西南地区、华南地区和华北地区的阳性感染率显著高于其他地区。以贵州遵义地区为例, 2006-2009年该地区规模养猪场的PPV阳性感染率分别为4.80%、7.22%、10.38%和14.20%, 呈现逐年递增的趋势。

## 3 致病机制

PPV可在病猪心脏、肺脏、脾脏和性腺中复制, 但其主要靶器官是母猪子宫, 子宫内病毒含量最高可达 $10^{12}$ 拷贝/mL。对仔猪而言, 病毒同样在心脏、肺脏、脾脏和性腺中复制, 以性腺含量最高。由此可见, 病毒对母猪的致病位置主要在繁殖器官, 同时, 也破坏肺脏等呼吸器官和脾脏等免疫器官; 而对小猪的损伤重要在于破坏脾脏和性腺等生理功能, 同时破坏心脏等中枢器官, 从而造成死亡。早期发现由PPV引起的疾病, 主要是初孕母猪的繁殖障碍, 但是随着研究的深入, 发现PPV还能引起仔猪的皮肤炎症和肠炎性腹泻, 而这些疾病在临床表现和病理特点上各不相同。

3.1 初孕母猪繁殖障碍 Bachmann等<sup>[9]</sup>选取妊娠35、48、55、72、99和105 d SPF母猪进行研究, 通过子宫内直接注射病毒的方式将PPV注射入试验猪一侧子宫角, 对侧子宫角注射无病毒细胞培养液作为对照。结果表明感染母猪不产生任何临床症状, 在感染后的第7-9天产生抗体。妊娠35、48和55 d的母猪体内的胎猪分别在感染病毒后的第5天和第22天死亡。妊娠72、99和105 d的母猪感染PPV后体内的胎猪可以正常分娩存活, 并于子宫内产生滴度很高的抗体。病毒即使扩散到对照组胎猪处也不会引起胎猪的死亡、木乃伊化或者刺激其产生抗体。Mengeling等<sup>[10]</sup>将PPV注射到妊娠34-36 d已免疫疫苗的母猪的胎猪尿囊腔中, 导致胎儿的浸溶和木乃伊化。发现在攻毒1 wk后病毒扩散到胎猪的很多组织, 并且大量复制。随着间隔时间加长, 从组织脏器分离的病毒量逐渐减少, 但是应用免疫荧光技术仍发现有大量的病毒存在于那些脏器, 这可能是脏器中死毒大量残留造成的。由于母猪已获疫苗免疫, 所以对于胎猪尿囊腔直接注射病毒, 既不会导致母猪流产, 也不会有病毒在母猪的组织中复制。PPV在子宫内胎儿之间传递、感染的现象也有报道, 但是发生的机率非常低。

## ■ 研发前沿

目前国内PPV只有一个血清型, 本课题组崔尚金研究员按照PPV的致病性与组织嗜性首先对其代表毒株进行了分类。

## ■ 相关报道

周斌等针对分子诊断新技术与基因工程疫苗防控等方面进行了阐述, 可以与本文的致病机制与免疫预防结合阅读, 对读者有一定指导意义。

### ■创新盘点

本文对猪细小病毒的生物型进行分类,对致病机制以及免疫预防都有全新的诠释,可供读者参考。

Wilhelm等<sup>[11]</sup>选用两个野毒株(143a和27a)和两个疫苗株(NADL-2和MSV),共分4组,采用口服和肌肉同时注射的方式对12头妊娠40 d的初孕母猪进行攻毒试验,所有母猪在妊娠100 d时被剖杀,采集胎儿脏器进行荧光定量PCR检测。结果表明,27a组母猪所产胎儿的组织(心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、胸腺、十二指肠、空肠、结肠、性腺)中病毒含量最高,最高的组织达 $10^{16}$ 拷贝/ $10^6$ 个细胞。其他3组存在病毒复制的组织很少,有的甚至仅仅肾脏存在病毒复制,病毒含量最高的组织仅为 $10^4$ 拷贝/ $10^6$ 个细胞。这个试验证实了27a这个PPV野毒株是强毒,可以在胎猪体内大量复制,进而加重母猪繁殖失败的严重程度。Song等<sup>[12]</sup>再次选用上述4个毒株对细小病毒的致病性进行研究,选择妊娠期为40 d的初孕母猪进行试验,攻毒采用口服和肌肉同时注射的方式,攻毒后50 d剖杀母猪,观察子宫内的胎儿状况,血液被收集用来检测PPV抗体,组织样本(肺脏和肾脏)用作病毒分离。试验结果证实,除了MSV组产生滴度较低的PPV抗体外,其他组在攻毒后14 d均能产生滴度较高的抗体,并且持续到试验结束。无论从木乃伊胎在窝产子数所占比例,还是病毒分离方面来看,均以27a组最为显著,进一步证实了27a株的强毒力和40 d感染PPV主要产生木乃伊胎的事实。

**3.2 仔猪皮炎** Kresse等于1975年发现了PPV的一个新毒株Kresse株,并确定其为皮炎型强毒株<sup>[13]</sup>,并其致病性进行了系统的研究,从患有严重皮肤炎症的猪体分离并培养PPV,选择胎猪肾细胞系和猪睾丸细胞系进行传代。选择细胞毒和脚趾病变组织匀浆为感染物,分别用皮肤敏感部位(拱嘴、唇、舌、蹄上皮肤和脚趾间皮肤)注射或口服和腹腔同时注射的方式,对12只同窝仔猪进行攻毒处理,试验结果证实,PPV作为唯一病原感染时,被感染猪出现了拱嘴、舌和蹄部的皮肤病变,临床表现为厌食、腹泻和结膜炎,证明PPV可以导致皮肤炎症。Lager等<sup>[14]</sup>选择NADL-8和Kresse两株PPV强毒株对未摄初乳仔猪进行接毒处理,并人工造成仔猪的皮肤损伤进行观察。目的是研究PPV在导致仔猪皮肤炎症过程中的作用以及两株PPV之间的毒力差别。试验结果表明,受伤皮肤处确实存在PPV的复制,但是并未发现明显的皮肤炎症和前面所述的渗出性皮炎或者口蹄处严重的溃烂等。

**3.3 仔猪肠炎性腹泻** 1983年夏季,Dea等<sup>[15]</sup>在加拿大魁北克省猪场发现大批的仔猪出现腹泻症

状,大小集中在2-3周龄,仔猪排泄量大,粪便形式为水样或黄痢,持续时间一般为1 wk,仔猪无呕吐现象,并且保持很好的食欲。试验人员应用电镜观察、双向免疫电泳和免疫荧光等技术对腹泻猪的肠道内容物进行分析。结果发现,大量的直径为18-26 nm的细小病毒样粒子存在,除轮状病毒外,排除了其他病毒和细菌的干扰之后,证明PPV与仔猪腹泻有一定关联,但PPV是否是腹泻产生的原发因素并未阐明。这是有关于由PPV引起的仔猪腹泻的仅有的报道。

综上,尽管PPV有3个临床表现型,而研究者也通过制作动物模型的方法来研究PPV这些疾病的临床发病情况与病毒感染的联系性,但现在我们对PPV的感染机制,包括细胞受体鉴定等方面还缺少支持性的信息,因此在今后的研究中有必要通过建立更为理想的细胞和动物模型,并利用多种生物学手段,如蛋白质谱等鉴定其细胞结合受体,超微病理分析其病毒在靶器官的精细分布深入揭示PPV的致病机制。

## 4 猪细小病毒病的免疫及预防

PPV感染目前无法进行治疗。为避免该病的发生,只能采取预防措施,主要是加强饲养管理、环境消毒和疫苗免疫。疫苗目前主要分灭活苗和弱毒疫苗,这都应该和流行毒株进行鉴别。

**4.1 种群管理** 从未发生过PPV病的猪场和地区,应该杜绝引进病猪和带毒猪,对公猪精液进行检查,PPV阴性者方可使用。发病猪场应特别防止小母猪在第1胎受孕时被感染,或把其配种期拖延到9月龄,因为此时母源抗体已消失,自动免疫力已经产生<sup>[16]</sup>。

**4.2 疫苗免疫** 最早发现和用于临床的PPV毒株是NADL-2弱毒株,NADL-2弱毒株疫苗是由Paul等将PPV强毒株经过50次以上的细胞连续传代致弱获得的<sup>[17]</sup>,并对怀孕的初产母猪进行了免疫保护试验,发现起到了很好的免疫保护效果。同时又发现在对母猪经口鼻接种PPV致弱苗后,致弱PPV不能经胎盘感染胎儿,但当子宫内接种PPV致弱苗后,致弱苗不仅可感染胎儿甚至导致胎儿死亡,因此PPV致弱苗应限于非怀孕母猪使用。Fujisaki等从死猪胎儿脑中分离到一株猪细小病毒(90HS株),然后在猪肾细胞上经连续低温(30℃-35℃)传代54代,获得了弱毒株,命名为HT株。该弱毒株接种猪,后本身没有病毒血症和其他临床症状,并且不能传染其他猪,但却可以维持长时间的PPV抗体。目前在日本已经

商品化的HT/SK弱毒株,正是在HT株在此基础上的研发, Akihiro等将HT传代至34代时60℃处理1h建立的安全性更好的HT/SK弱毒株. 广西兽医研究所病毒室蒋玉雯等分离到一株自然弱毒株(PPV-N株)<sup>[18]</sup>,并于2006年应用PPV-N株弱毒疫苗进行区域试验,试验结果显示,PPV-N株弱毒疫苗能有效抵抗PPV强毒攻击,在猪场应用取得了明显的经济和社会效益.

有关PPV灭活苗的报道最早开始与1976年,20世纪80年代,PPV灭活苗在美国、澳大利亚以及法国等国家得到了普遍的应用.在PPV的灭活疫苗的研制中,应用的灭活剂有福尔马林<sup>[19]</sup>、旦一丙内酯(p-pL)(Joo等<sup>[20]</sup>1977)、BEI(二乙烯亚胺)(Wrathall等1984, EdwardS, 1986)以及AEI(一乙酞乙烯亚胺)(潘雪珠等<sup>[21]</sup>1986)等.目前,应用于PPV灭活苗的制备中经常采用的佐剂是油水乳剂、氢氧化铝. PPV灭活疫苗的研究、开发与应用已经历了30余年,目前仍是预防猪细小病毒感染的主要手段.

Martínez等<sup>[22]</sup>(1992)将PPV VP2基因成功的克隆到杆状病毒表达系统中,利用VP2蛋白自我组装的特性,在体外成功的表达了PPV类病毒粒子(virus-like particles, VLPs),用其免疫母猪能诱导产生免疫应答.其免疫效果与商品化的PPV疫苗相同. Antonis等应用杆状病毒表达载体系统表达出PPV类病毒粒子,通过优化表达的条件使其表达量达到工业化生产规模,经试验表明豚鼠和猪在经注射亚微克剂量的PPV-VLPs油佐剂疫苗后即可诱发产生了高滴度的抗体,试验表明这种重组的亚单位疫苗克服了传统的PPV疫苗中存在的一些缺点. Sedlik等将PPV VP2作为载体将淋巴细胞脉络丛脑炎病毒(LCMV)的118-32位氨基酸的抗原决定簇区与VP2的N端相连,然后克隆到杆状病毒表达载体PACYM,在昆虫细胞中转染表达PPVVP2-LCM蛋白.并进行了动物试验,结果显示该重组蛋白不仅可以诱导强烈的CTL反应,而且在体内持续时间长达9 mo,并可抵抗致死量的LCMV攻击<sup>[23]</sup>.随后,又将上述表达的PPV-VP2-LCMV蛋白与LCMV的CD8<sup>+</sup>T细胞抗原决定簇多肽共价结合于1 $\mu$ m的脂质微球上一起进行了免疫小鼠的比较,结果发现两种方法都诱导产生了很强的CD8<sup>+</sup>T细胞反应.但PPV VP2-LCMV携带的抗原量比脂质体微球少100倍时,仍能诱导比脂质体微球高6倍的CTL反应,并且只有PPV VP2-LCMV免疫的小鼠能抵抗致死量的LCMV的攻击<sup>[24]</sup>,而脂质体微球却不能.

Richard等用PPV VP2作为载体与乙肝病毒HBsAg的抗原决定簇区多肽共价结合,并利用表达的蛋白免疫小鼠诱导,结果显示产生了很强的针对插入的HBsAg决定簇的T细胞反应,同时能抵抗乙肝病毒的致死性攻击.这些结果均说明PPV VP2类病毒粒子,作为一种抗原的转载体具有很大的潜在价值,可为多价重组疫苗的研究创造良好条件.

4.3 免疫程序 新生仔猪PPV疫苗的免疫接种可以选择在20周龄左右进行,后备种猪要在配种前20 d以前接种,经产母猪应在产后15 d进行,每年接种2次,连续3年即可;种公猪每年春秋两季分别进行;对于曾发生过PPV病的猪,大多数猪感染后获得免疫力,体内已产生持续时间长、滴度较高的抗体,可以获得良好的保护,这些猪不需再接种<sup>[25]</sup>.

目前常规灭活疫苗和弱毒疫苗在一定程度上减少了PPV感染大规模的爆发,但由于此类病毒存在免疫效果欠理想和潜在排毒风险高等不足,运用生物工程技术开发包括病毒药颗粒和基因工程亚单位疫苗结合新型载体及佐剂的研究还应进一步深入,以尽快开发出更为安全理想的防治PPV的有效疫苗.同时在其致病机制方面如其引起腹泻原因及与其他病毒混合感染后机体反应也需要深入研究.

## 5 结论

猪细小病毒为引起母猪繁殖障碍的主要病原体之一,可以引起初产母猪胎猪死产、木乃伊胎、早期胚胎死亡和不育,给养猪业造成很大损失.相关调查发现,PPV和猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、猪圆环病毒2型(porcine circovirus type 2, PCV2)混合感染的现象非常普遍,仍然是引起繁殖障碍的重要原因. PPV的早期研究主要集中在病原、理化性质与防治方面,随后在分子水平上明确了病毒基因组的一级结构、转录与翻译图谱,但实际研究中仍然存在着许多问题:(1)由于缺少前期的基础研究,现阶段的PPV研究中,无法深入地探究病毒各个基因和蛋白的功能,不能明确病毒与宿主、细胞的相互作用机制,无法从基因角度区分毒株致病力的强弱、改造毒力基因,因此构建PPV的感染性克隆,从分子生物学角度探究PPV的相关情况将成为PPV研究的重要内容;(2)病毒的致病机制研究尚停留在理论分析上,对于为什么引

## ■名词解释

杆状病毒表达系统:杆状病毒只来源于无脊椎动物,虽然已发现600多种杆状病毒,但进行分子生物学研究的不到20种.杆状病毒的基因组为单一闭合环状双链DNA分子,大小为80-160 kbp,其基因组可在昆虫细胞核复制和转录. DNA复制后组装在杆状病毒的核衣壳内,后者具有较大的柔韧性,可容纳较大片段的外源DNA插入,因此是表达大片段DNA的理想载体.

■同行评价  
本文内容全面,具  
有一定的可读性.

起死胎、畸形胎、木乃伊胎、流产及病弱仔猪,对母猪有无影响等一系列问题都有待于试验的探索与验证,有待进一步的研究.

## 6 参考文献

- Siegl G. The parvoviruses. *Virol Monogr* 1976; 15: 1-109 [PMID: 181899]
- Bachmann PA, Hoggan MD, Kurstak E, Melnick JL, Pereira HG, Tattersall P, Vago C. Parvoviridae: second report. *Intervirology* 1979; 11: 248-254 [PMID: 372134 DOI: 10.1159/000149041]
- Zeeuw E J, Leinecker N, Herwig V. Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *J Gen Virol* 2007; 88: 420-427 [PMID: 17251558 DOI: 10.1099/vir.0.82302-0]
- 胡家芬, 张楚瑜. 湖北猪场猪细小病毒的首次分离与鉴定. *微生物杂志* 1992; 12: 31-34
- 蔺文成, 胡峰, 任梅, 崔玉东, 钱爱东, 崔尚金. 猪细小病毒病国内流行状况以及防治策略. *猪业科学* 2010; 27: 90-95
- Kerr JR, Cotmore SF, Bloom ME, Linden RM, Parrish CR. Parvoviruses. London: Edward Arnold Publishers Ltd., 2006: 5-14
- 张代芬, 张东, 马孟根, 陈斌, 王泽洲, 张永宁, 邢坤, 胡诚隆, 罗若兰. 四川省部分种畜(猪)场猪细小病毒病血清抗体的检测. *四川畜牧兽医* 2002; 29: 20
- 黄夏, 陈义祥, 何丹. 广西猪细小病毒与PRRSV、CSFV、PCV2、PRV混合感染的检测. *广西畜牧兽医* 2007; 23: 54-56
- Bachmann PA, Sheffy BE, Vauhan JT. Experimental in utero infection of fetal pigs with a porcine parvovirus. *Infect Immun* 1975; 12: 455-460 [PMID: 1165118]
- Mengeling WL, Cutlip RC. Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of five-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am J Vet Res* 1975; 36: 1173-1177 [PMID: 1098529]
- Wilhelm S, Zeeuw EJ, Selbitz HJ, Truyen U. Tissue distribution of two field isolates and two vaccine strains of porcine parvovirus in foetal organs after experimental infection of pregnant sows as determined by real-time PCR. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2005; 52: 323-326 [PMID: 16316393 DOI: 10.1111/j.1439-0450.2005.00878.x]
- Song C, Zhu C, Zhang C, Cui S. Detection of porcine parvovirus using a taqman-based real-time pcr with primers and probe designed for the NS1 gene. *Virol J* 2010; 7: 353 [PMID: 21126330 DOI: 10.1186/1743-422X-7-353]
- Luo R, Xiao S, Jiang Y, Jin H, Wang D, Liu M, Chen H, Fang L. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses interferon-beta production by interfering with the RIG-I signaling pathway. *Mol Immunol* 2008; 45: 2839-2846 [PMID: 18336912 DOI: 10.1016/j.molimm.2008.01.028]
- Lager KM, Mengeling WL. Porcine parvovirus associated with cutaneous lesions in piglets. *J Vet Diagn Invest* 1994; 6: 357-359 [PMID: 7948207 DOI: 10.1177/104063879400600313]
- Dea S, Elazhary MA, Martineau GP, Vaillancourt J. Parvovirus-like particles associated with diarrhea in unweaned piglets. *Can J Comp Med* 1985; 49: 343-345 [PMID: 2412678]
- 戎伟, 梅双双, 杨润德. 猪细小病毒的危害检测与防控. *中国兽医杂志* 2004; 40: 45-47
- Mengeling WL, Pejsak Z, Paul PS. Biological assay of attenuated strain NADL-2 and virulent strain NADL-8 of porcine parvovirus. *Am J Vet Res* 1984; 45: 2403-2407 [PMID: 6098200]
- 蒋玉雯, 黄安国, 冯军. 猪细小病毒N株的生物学和免疫学特征性研究. *畜牧兽医学报* 1992; 23: 73-79
- Fujisaki Y, Murakami Y. Immunity to infection with porcine parvovirus in pigs inoculated with the attenuated HT- strain. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)* 1982; 22: 36-37 [PMID: 7078661]
- Joo HS, Johnson RH. Serological responses in pigs vaccinated with inactivated porcine parvovirus. *Aust Vet J* 1977; 53: 550-552 [PMID: 565631 DOI: 10.1111/j.1751-0813.1977.tb07945.x]
- 潘雪珠, 粟寿初, 张婉华. 猪细小病毒灭活疫苗的安全性和免疫力. *上海农业学报* 1998; 4: 1-10
- Martínez C, Dalsgaard K, López de Turiso JA, Cortés E, Vela C, Casal JI. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine* 1992; 10: 684-690 [PMID: 1523879 DOI: 10.1016/0264-410X(92)90090-7]
- Sedlik C, Saron M, Sarraseca J, Casal I, Leclerc C. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 7503-7508 [PMID: 9207121]
- Sedlik C, Dridi A, Deriaud E, Saron MF, Rueda P, Sarraseca J, Casal JI, Leclerc C. Intranasal delivery of recombinant parvovirus-like particles elicits cytotoxic T-cell and neutralizing antibody responses. *J Virol* 1999; 73: 2739-2744 [PMID: 10074120 DOI: 10.1073/pnas.94.14.7503]
- 卫功树. 浅谈猪细小病毒与母猪繁殖失能. *现代农业科技* 2007; (14): 176

编辑 李军亮 电编 闫晋利



# 纳米氧化物材料在仔猪抗腹泻中的应用

杨青, 任晓峰

杨青, 湖南农业大学动物医学院临床兽医系 湖南省长沙市 410128  
任晓峰, 东北农业大学动物医学院预防兽医系 黑龙江省哈尔滨市 150030  
杨青, 博士, 教授, 主要从事家畜繁殖障碍机制的研究。  
北京化工大学化工资源有效利用国家重点实验室开放课题基金资助项目, No. CRE-2011-C-101  
作者贡献分布: 本文主要由杨青负责文章的撰写; 任晓峰负责修改与审核。  
通讯作者: 杨青, 教授, 410128, 湖南省长沙市芙蓉区农大路1号, 湖南农业大学动物医学院。qingyanghn@gmail.com  
电话: 0731-84673718  
收稿日期: 2012-09-17 修回日期: 2012-12-20  
接受日期: 2013-01-05 在线出版日期: 2013-01-08

## Use of nano-oxide materials as anti-diarrhea agents in piglets

Qing Yang, Xiao-Feng Ren

Qing Yang, Department of Clinical Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan Province, China  
Xiao-Feng Ren, Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang Province, China  
Supported by: Beijing University of Chemical Technology State Key Laboratory of Chemical Resource Open Topic Funded, No. CRE-2011-C-101  
Correspondence to: Qing Yang, Professor, Department of Clinical Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, 1 Nongda Road, Furong District, Changsha 410128, Hunan Province, China. qingyanghn@gmail.com  
Received: 2012-09-17 Revised: 2012-12-20  
Accepted: 2013-01-05 Published online: 2013-01-08

## Abstract

Diarrhea is a common intestinal disease with high morbidity and mortality, seriously affecting the growth performance and survival of piglets. Due to the restricted use of antibiotics, new feed additives or drugs have been paid more and more attention. This article reviews the use of nano-zinc oxide and montmorillonite as anti-diarrhea agents in piglets.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Nano-oxide materials; Diarrhea; Piglet; Zinc oxide; Montmorillonite

Yang Q, Ren XF. Use of nano-oxide materials as anti-diarrhea agents in piglets. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*

2013; 21(1): 71-74

## 摘要

仔猪腹泻是猪场常见的一种肠道疾病, 由于其高发病率和死亡率, 严重影响仔猪的健康生长和存活。由于抗生素的使用越来越受到限制, 新型的饲料添加剂或药物越来越受到重视。本文主要综述纳米氧化锌和蒙脱石在抗仔猪腹泻中的应用, 旨在为仔猪健康生长提供参考。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 纳米材料; 腹泻; 仔猪; 氧化锌; 蒙脱石

杨青, 任晓峰. 纳米氧化物材料在仔猪抗腹泻中的应用. *世界华人消化杂志* 2013; 21(1): 71-74  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/71.asp>

## 0 引言

仔猪腹泻是目前规模化养猪生产中一种较常见多发病, 据调查30 kg以下的仔猪全年平均发病率可达46.5%, 死亡率10.3%, 冬季发病率和死亡率更高<sup>[1]</sup>。仔猪腹泻造成的危害很大, 轻度腹泻会导致仔猪营养不良及生长受阻, 严重时则导致仔猪脱水, 甚至死亡, 有些仔猪即使愈后也往往生长发育不良, 免疫力下降。引起腹泻的原因很复杂, 根据其病因可分为感染性腹泻和非感染性腹泻, 其中感染性腹泻主要由病原微生物或寄生虫所引起, 包括细菌、病毒和寄生虫等, 非感染性腹泻主要因环境变化、断奶等外界刺激以及饲喂管理不当等因素引起。腹泻会引起机体内环境的改变, 造成胃肠道功能紊乱。饲料中添加抗生素是防治畜禽腹泻的重要措施, 但抗生素的长期使用会诱导病原微生物产生耐药性、畜产品及环境中抗生素的残留等问题, 而且会导致消化道中有益菌的增殖, 从而影响肠道微生态平衡失调, 即产生抗生素相关性腹泻。因此, 如何有效地防治仔猪腹泻、寻找安全、高效、无残留的物质来替代抗生素是畜禽营养与免疫学研究的重要方向。

## ■背景资料

仔猪腹泻是猪场常见的一种肠道疾病, 目前没有安全有效的防治方法。纳米材料的兴起使其在很多领域都应用发展迅速, 但在畜牧业中还应用还处于起始阶段。本文综述了近年来纳米氧化物氧化锌和蒙脱石等在抗仔猪腹泻中的应用, 这对该病的防治有一定的意义。

## ■同行评议者

吴道澄, 教授, 西安交通大学生命学院

## ■ 研发前沿

随着人们对食品安全与环境保护意识的不断增强及对抗生素认识的不断深入,畜产品药物残留以及抗生素的耐药性等问题已越来越受到关注。

## 1 纳米氧化锌在仔猪抗腹泻中的研究

**1.1 高锌的抗腹泻作用** 锌是动物生长的必需元素,由于抗生素的使用越来越受到限制,锌盐由于其很好的抗菌抑菌作用,在防止断奶仔猪腹泻中发挥着重要作用。断奶仔猪日粮中添加锌可提高日增重,减少腹泻的发生<sup>[2]</sup>;当添加药理水平的氧化锌(3 000 mg/kg)时,可以有效地控制仔猪腹泻,改善仔猪生产性能<sup>[3-6]</sup>。研究表明锌能保持小肠黏膜的完整性,促进小肠绒毛的发育和营养的吸收,断奶后仔猪饲料中添加氧化锌会使整个小肠黏膜厚度、绒毛高度、绒毛宽度和绒毛高度隐窝深度比值增加,而隐窝深度降低<sup>[7]</sup>;氧化锌还能维持肠道微生物群落和大肠菌落的稳定,增强机体对病原的抵抗力<sup>[8,9]</sup>。日粮中锌的补充能在mRNA和蛋白水平减少干细胞因子(stem cell factor, SCF)的表达,从而导致小肠黏膜巨细胞的减少和组胺的释放,可在一定程度上预防与断奶引起的相关腹泻<sup>[5]</sup>。除了抗菌作用外,高锌还可通过促进消化道增加Ghrelin的合成提高采食量,从而有助于猪的生长<sup>[10]</sup>。

目前,在乳猪料的生产中添加药理水平的氧化锌已成为普遍利用的技术,但高锌日粮不仅带来了锌源的浪费而且还造成环境污染的问题。高锌的拮抗作用会影响其他微量元素的吸收,导致铜、铁吸收的不平衡,影响动物健康。高锌还可以与饲料中的植酸形成螯合盐复合物导致饲料中植酸酶的水解效率下降<sup>[11]</sup>。也有研究认为,当锌摄入量超过体内各种排泄器官的排泄能力,则会破坏机体内恒稳机制。因此,长期使用高锌日粮仔猪就会出现皮肤苍白、被毛粗乱卷曲、贫血等现象<sup>[12]</sup>。此外,无机锌不易被吸收,高锌日粮造成大部分锌随粪便排泄到环境中,造成环境污染,最终也将危害到人类健康<sup>[13,14]</sup>。

### 1.2 纳米氧化锌在仔猪抗腹泻中的应用

**1.2.1 纳米氧化锌的特性:** 纳米科技兴起于20世纪80年代后期,由于纳米材料独特的物理化学特性,在各个领域越来越受到重视。目前在动物生产中的研究和应用还比较少。纳米氧化锌又称超微细氧化锌,由极细晶粒组成的白色超微细粉末,其粒径介于1-100 nm的新型高功能精细无机产品,具有一般氧化锌无法比拟的性能,包括比表面积大、表面能高、表面原子所占比例大以及纳米材料所特有的一些效应等<sup>[15]</sup>。纳米氧化锌由于物理性质的改变,其物理特性表现为无毒性、无味、无刺激、易分解、不变质、热稳定性好、非迁移性、非线性光传导、荧光性、压电性、静电屏蔽、屏蔽紫外线等特性;

由于纳米氧化锌比表面积大,很容易被吸收。另外,纳米氧化锌有极强的化学活性,能与多种有机物发生氧化反应(包括细菌内的有机物),将大部分细菌、病毒杀死,同时还具有特异催化和光催化等化学特性。

**1.2.2 纳米氧化锌的抗腹泻作用:** 马恒东等<sup>[16]</sup>通过翻转肠囊法研究仔猪小肠吸收纳米氧化锌的实验发现:纳米氧化锌的吸收速率显著高于饲料级氧化锌。饲料中添加纳米氧化锌,比一般氧化锌的药效大幅度提高,低剂量纳米氧化锌可替代高锌促生长效果。断奶仔猪日粮中添加375 mg/kg的“晶锌蓓”(含95%的纳米氧化锌)能显著提高仔猪的日增重和降低仔猪的腹泻率,而且在日增重、料肉比以及仔猪腹泻等指标上考察可替代高锌3 000 mg/kg<sup>[17]</sup>。仔猪日粮中添加300 mg/kg的纳米氧化锌可提高仔猪血清中的免疫球蛋白IgM以及肝脏组织中金属硫蛋白(MT)的含量,使仔猪的免疫能力增强<sup>[18]</sup>。添加400 mg/kg纳米氧化锌时,其抗腹泻效果可以达到甚至超过高锌所产生的效果<sup>[19]</sup>。由于纳米氧化锌具有优异的吸附性能和杀菌作用,利用其吸附作用可研发具有特异性吸附的饲料添加剂,降低饲料中有毒、有害物质对动物的危害;利用其杀菌作用,研发对有害菌具有特异性杀灭作用,形成动物肠道健康微生态的保健添加剂;同时也可研发纳米氧化锌免疫佐剂,提高疫苗对畜禽的免疫效果。

## 2 蒙脱石在仔猪抗腹泻中的应用

**2.1 蒙脱石的特性** 蒙脱石是一种天然形成的、可膨胀的硅酸盐矿物质,具有膨胀性、吸附性、触变性、带电和离子交换等特性,其结构为铝氧八面体层与硅氧四面体层交替排列的2:1型层状结构。蒙脱石具有天然纳米级结构,层间距无水时为0.096 nm,充分水化的环境中,吸水后体积增大20-30倍。蒙脱石目前在临床上被广泛用来治疗腹泻和消化道溃疡,是一种新型的矿物药剂。由于蒙脱石具有吸附、固定和阳离子交换等特性在养猪业中的应用也越来越广泛。许多试验表明蒙脱石具有吸附细菌、病毒及其毒素和保护消化道黏膜的作用,可用于饲料脱霉、治疗仔猪腹泻和促进仔猪生长等。

**2.2 蒙脱石抗仔猪腹泻的作用** 与氧化锌作用不同的是,蒙脱石本身无杀菌或抑菌作用,由于其具有层状结构和不均匀性带点从而表现出强的吸附性和阳离子交换能力,可固定和吸附消化道内的霉菌毒素、病毒、病菌及其产生的毒素,主要通过保护和修复肠道黏膜而起到治疗腹泻

的作用<sup>[20]</sup>。经改性和纳米化处理后的蒙脱石, 其抗菌性能明显增强<sup>[21]</sup>。纳米蒙脱石是一种新型的具有抗腹泻和饲料脱霉作用的饲料添加剂。由于纳米蒙脱石比普通蒙脱石具有更大的比表面积和强吸附力, 研究表明纳米蒙脱石对治疗仔猪腹泻的疗效比较显著<sup>[12,22]</sup>, 在生产中可替代抗生素和高锌, 是无抗生素首选添加剂。用纳米蒙脱石对仔猪腹泻有很好的治疗效果, 呈一定的剂量依赖作用<sup>[22-24]</sup>; 在治疗仔猪白痢和早期断奶腹泻综合征发现, 其治疗总有效率高于抗菌药物烟酸诺氟沙星注射液, 当与抗菌药物联用时抗腹泻效果更好, 纳米蒙脱石对非感染仔猪腹泻总有效率达94.1%<sup>[23]</sup>。

由于蒙脱石具有独特的物理和化学特性, 近年来, 蒙脱石还被作为载体来控制药物分子的释放以及基因治疗等。蒙脱石作为载体, 可使药物分布更广泛、有利于药物的溶解、提高稳定性并调整药物的释放方式等<sup>[25-28]</sup>。最近有研究人员合成氧化锌-蒙脱石聚合物(ZnO-MMT), 这种ZnO-MMT可以将氧化锌插入到蒙脱石片层间, 同时还可就将氧化锌吸附到蒙脱石的表面<sup>[29,30]</sup>。断奶仔猪日粮中添加500或750 mg/kg的ZnO-MMT在提高仔猪生长性能、减轻断奶后腹泻, 增强肠黏膜的完整性以及胰腺和小肠内容物中的消化酶, 其效率相当于添加2 000 mg/kg的氧化锌, 这种低浓度的ZnO-MMT喂养断奶仔猪不仅能保证仔猪的生长还可以减少环境污染<sup>[31]</sup>。

由于纳米蒙脱石可高效吸附猪、鸡饲料中的黄曲霉毒素, 阻止其通过吸收途径进入体内, 并从粪便中排出体外, 从而降低毒素在动物体组织中的残留, 减轻毒素对动物生长的不良影响<sup>[32-36]</sup>。纳米蒙脱石中还含有硒等微量元素, 可以弥补微量元素的不足, 对畜禽的生长有促进作用。纳米蒙脱石还可方便地应用于猪的垫料中, 大量吸附室内氨等有害气体, 保持环境干燥, 抑制细菌繁殖, 这将有助于防御呼吸道疾病和断奶仔猪腹泻综合征。

### 3 结论

随着人们对食品安全与环境保护意识的不断增强及对抗生素认识的不断深入, 畜产品药物残留以及抗生素的耐药性等问题已越来越受到关注。目前, 寻找安全、高效、无残留的物质来替代抗生素是畜禽养殖的一个重要方向。尽管纳米材料在畜牧业中的研究和应用还处于初级阶段, 但由于其独特的化学和物理性质已显示了其优势。纳米材料特别是一些天然纳米矿物不

仅可以抗腹泻、促进动物生长、剂量小等优势, 更重要的是可减少甚至对环境无污染, 有利于保障人类健康, 因此将会在畜牧业生产中具有非常广泛的应用前景。

### 4 参考文献

- 1 胡德武. 仔猪腹泻病的综合防治. 畜禽业 2012; (1): 50-51
- 2 Shankar AH, Prasad AS. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 447S-463S [PMID: 9701160]
- 3 Hahn JD, Baker DH. Growth and plasma zinc responses of young pigs fed pharmacologic levels of zinc. *J Anim Sci* 1993; 71: 3020-3024 [PMID: 8270523]
- 4 Hill GM, Mahan DC, Carter SD, Cromwell GL, Ewan RC, Harrold RL, Lewis AJ, Miller PS, Shurson GC, Veum TL. Effect of pharmacological concentrations of zinc oxide with or without the inclusion of an antibacterial agent on nursery pig performance. *J Anim Sci* 2001; 79: 934-941 [PMID: 11325200]
- 5 Ou D, Li D, Cao Y, Li X, Yin J, Qiao S, Wu G. Dietary supplementation with zinc oxide decreases expression of the stem cell factor in the small intestine of weanling pigs. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 820-826 [PMID: 17475461 DOI: 10.1016/j.jnutbio.2006.12.022]
- 6 Molist F, Hermes RG, de Segura AG, Martín-Orúe SM, Gasa J, Manzanilla EG, Pérez JF. Effect and interaction between wheat bran and zinc oxide on productive performance and intestinal health in post-weaning piglets. *Br J Nutr* 2011; 105: 1592-1600 [PMID: 21477404 DOI: 10.1017/S0007114510004575]
- 7 Li X, Yin J, Li D, Chen X, Zang J, Zhou X. Dietary supplementation with zinc oxide increases Igf-I and Igf-I receptor gene expression in the small intestine of weanling piglets. *J Nutr* 2006; 136: 1786-1791 [PMID: 16772438]
- 8 Katouli M, Melin L, Jensen-Waern M, Wallgren P, Möllby R. The effect of zinc oxide supplementation on the stability of the intestinal flora with special reference to composition of coliforms in weaned pigs. *J Appl Microbiol* 1999; 87: 564-573 [PMID: 10583685 DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00853.x]
- 9 Owusu-Asiedu A, Nyachoti CM, Marquardt RR. Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. *J Anim Sci* 2003; 81: 1790-1798 [PMID: 12854816]
- 10 Yin J, Li X, Li D, Yue T, Fang Q, Ni J, Zhou X, Wu G. Dietary supplementation with zinc oxide stimulates ghrelin secretion from the stomach of young pigs. *J Nutr Biochem* 2009; 20: 783-790 [PMID: 18926680 DOI: 10.1016/j.jnutbio.2008.07.007]
- 11 Augspurger NR, Spencer JD, Webel DM, Baker DH. Pharmacological zinc levels reduce the phosphorus-releasing efficacy of phytase in young pigs and chickens. *J Anim Sci* 2004; 82: 1732-1739 [PMID: 15217001]
- 12 王修启, 陈宝妮, 戴文滔, 武力, 卓曲, 李世波, 黄周可, 韩秀山, 谌刚. 纳米蒙脱石替代氧化锌对断奶仔猪生产性能的影响. 湖北畜牧兽医 2007; (9): 7-9
- 13 杨定清, 傅绍清. 施用高锌猪粪对土壤环境污染的影响. 四川环境 2000; 19: 30-31
- 14 辜玉红, 童晓莉, 钟正泽. 猪日粮中添加不同剂量铜锌砷对环境污染程度的研究. 当代畜牧 2005; (8): 42-84

### ■应用要点

与氧化锌作用不同的是, 蒙脱石本身无杀菌或抑菌作用, 由于其具有层状结构和不均匀性带点从而表现出强的吸附性和阳离子交换能力, 可固定和吸附消化道内的霉菌毒素、病毒、病菌及其产生的毒素, 主要通过保护和修复肠道黏膜而起到治疗腹泻的作用。



### ■同行评价

本文综述了纳米氧化锌、蒙脱石等在防治仔猪腹泻方面的应用,对利用安全、高效、无残留的物质来替代抗生素有一定意义。

- 15 程晓丽, 霍丽华, 徐英明, 赵辉, 高山, 赵经贵. 氧化锌纳米粉体的制备及其光催化性能研究. *光散射学报* 2006; 18: 306-308
- 16 马恒东, 王之盛, 周安国, 任俊玲, 王讯. 翻转肠囊法研究仔猪小肠对纳米氧化锌的吸收. *中国畜牧杂志* 2005; 41: 25-26
- 17 王建辉, 廖三赛, 李德雄. 晶锌蓓(纳米氧化锌)对断奶仔猪生产性能的影响. *养殖与饲料* 2003; (7): 8-9
- 18 方洛云, 邹晓庭, 蒋林树, 吴国娟. 不同锌源对断奶仔猪免疫和抗氧化作用的影响. *中国兽医学报* 2005; 25: 201-203
- 19 喻兵权, 张宏福, 唐湘方, 卢庆萍, 陆伟, 邢方军. 纳米氧化锌对断奶仔猪生长性能及腹泻率的影响. *中国饲料* 2008; (1): 18-21
- 20 李旭, 陈阳. 蒙脱石在养猪业中的应用. *养猪* 2011; (4): 18-21
- 21 Han YS, Lee SH, Choi KH, Park I. Preparation and characterization of chitosan-clay nanocomposites with antimicrobial activity. *J Phys Chem Solids* 2010; 71: 464-467 [DOI: 10.1016/j.jpcs.2009.12.012]
- 22 王修启, 戴文滔, 陈宝妮, 武力, 卓曲, 黎晓林, 黄周可. 不同水平纳米蒙脱石对断奶仔猪生产性能的影响. *粮食与饲料工业* 2008; (1): 36-37
- 23 谢长青, 吕大丰, 谌刚, 黄周可, 韩秀山. 纳米蒙脱石治疗仔猪腹泻的临床效果观察. *吉林畜牧兽医* 2006; 27: 7-9, 11
- 24 韩秀山, 应华, 陈法荣, 王国中, 许家亮. 纳米蒙脱石在乳仔猪饲料中替代氧化锌的试验. *河南畜牧兽医* 2009; 30: 44
- 25 Aguzzi C, Cerezo P, Viseras C, Caramella C. Use of clays as drug delivery systems: possibilities and limitations. *Appl Clay Sci* 2007; 36: 22-36 [DOI: 10.1016/j.clay.2006.06.015]
- 26 Zheng JP, Luan L, Wang HY, Xi LF, Yao KD. Study on ibuprofen/montmorillonite intercalation composites as drug release system. *Appl Clay Sci* 2007; 36: 297-301 [DOI: 10.1016/j.clay.2007.01.012]
- 27 田智慧, 路新卫, 朱全红, 朱志博, 韦莉萍, 丁婷, 周春琼. 5-氟尿嘧啶/纳米蒙脱土缓释药物的制备及性能. *世界华人消化杂志* 2012; 20: 60-63
- 28 Joshi GV, Patel HA, Kevadiya BD, Bajaj HC. Montmorillonite intercalated with vitamin B1 as drug carrier. *Appl Clay Sci* 2009; 45: 248-253 [DOI: 10.1016/j.clay.2009.06.001]
- 29 Fatimah I, Wang SB, Wulandari D. ZnO/montmorillonite for photocatalytic and photochemical degradation of methylene blue. *Appl Clay Sci* 2011; 53: 553-560 [DOI: 10.1016/j.clay.2011.05.001]
- 30 Khaorapapong N, Khumchoo N, Ogawa M. Preparation of zinc oxide-montmorillonite hybrids. *Mater Lett* 2011; 65: 657-660 [DOI: 10.1016/j.matlet.2010.11.052]
- 31 Hu C, Song J, You Z, Luan Z, Li W. Zinc oxide-montmorillonite hybrid influences diarrhea, intestinal mucosal integrity, and digestive enzyme activity in weaned pigs. *Biol Trace Elem Res* 2012; 149: 190-196 [PMID: 22539019 DOI: 10.1007/s12011-012-9422-9]
- 32 齐德生, 刘凡, 于炎湖, 何万领, 涂华荣. 蒙脱石及改性蒙脱石对黄曲霉毒素B1的吸附研究. *畜牧兽医学报* 2003; 34: 620-622
- 33 Shi YH, Xu ZR, Feng JL, Xia MS, Hu CH. Effects of modified montmorillonite nanocomposite on growing/finishing pigs during aflatoxicosis. *Asian-Aust J Anim Sci* 2005; 18: 1305-1309
- 34 Shi YH, Xu ZR, Feng JL, Wang CZ. Efficacy of modified montmorillonite nanocomposite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Anim Feed Sci Tech* 2006; 129: 138-148 [DOI: 10.1016/j.anifeeds.2005.12.006]
- 35 Shi YH, Xu ZR, Wang CZ, Sun Y. Efficacy of two different types of montmorillonite to reduce the toxicity of aflatoxin in pigs. *New Zeal J Agr Res* 2007; 50: 473-478 [DOI: 10.1080/00288230709510315]
- 36 Shi YH, Xu ZR, Sun Y, Wang CZ, Feng JL. Effects of two different types of montmorillonite on growth performance and serum profiles of broiler chicks during aflatoxicosis. *Turk J Vet Anim Sci* 2009; 33: 15-20

编辑 李军亮 电编 闫晋利



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

### • 消息 •

## 中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》 影响因子 0.873

**本刊讯** 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示,2011年《世界胃肠病学杂志(英文版)》总被引频次6 979次,影响因子0.873,综合评价总分88.5分,分别位居内科学类52种期刊的第1位、第3位、第1位,分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第11位、第156位、第18位;其他指标:即年指标0.219,他引率0.89,引用刊数619种,扩散因子8.84,权威因子2 144.57,被引半衰期4.7,来源文献量758,文献选出率0.94,地区分布数26,机构分布数1,基金论文比0.45,海外论文比0.71。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界胃肠病学杂志(英文版)》再度被收录为“中国科技核心期刊”(中国科技论文统计源期刊)。根据2011年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD 2011)统计结果,《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获2011年“百种中国杰出学术期刊”称号。

# 贲门失弛缓症的研究进展

王爽, 刘冰熔

王爽, 刘冰熔, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150000

作者贡献分布: 本文综述由王爽完成; 刘冰熔审核。

通讯作者: 刘冰熔, 教授, 主任医师, 150000, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路148号, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科。liubingrong@medmail.com.cn

电话: 0451-86605980

收稿日期: 2012-11-19 修回日期: 2012-12-18

接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2013-01-08

## Recent progress in treatment of achalasia

Shuang Wang, Bing-Rong Liu

Shuang Wang, Bing-Rong Liu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China  
Correspondence to: Bing-Rong Liu, Professor & Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China. liubingrong@medmail.com.cn  
Received: 2012-11-19 Revised: 2012-12-18  
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2013-01-08

### Abstract

Achalasia is a rare primary esophageal motility disorder characterized by impaired relaxation of the lower esophageal sphincter, absent or decreased esophageal peristaltic waves and synchronous contractions. As the exact pathogenesis of the disease remains unclear, treatment options focus on the alleviation of the functional obstruction caused by lower esophageal sphincter and prevention of gastroesophageal reflux disease at the same time. Treatment modalities include pharmacological therapy, interventional therapy, surgical treatment and spinal rotation massage. This article reviews the latest progress in treatment of achalasia, with particular emphasis on the evolution of main treatments which include endoscopic pneumatic dilation, Heller myotomy and per-oral endoscopic myotomy (POEM).

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Achalasia; Treatment; Heller myotomy; Per-oral endoscopic myotomy; Endoscopic pneumatic dilation

Wang S, Liu BR. Recent progress in treatment of achalasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 75-81

### 摘要

贲门失弛缓症是一种罕见的原发性食管动力障碍性疾病, 以食管下段括约肌的松弛功能受损, 食管蠕动波减少或消失, 食管同步收缩为特征。由于本病的发病机制仍不明确, 现有的治疗方式主要以缓解由食管下段括约肌引起的功能性梗阻为目的, 同时保持降低食管下段括约肌压力与预防发生胃食管返流性疾病之间的平衡。本病的治疗方式包括药物治疗, 介入治疗, 手术治疗和中医整脊疗法。本文就贲门失弛缓症的最新治疗进展作一综述, 重点讨论贲门失弛缓症现有的主要治疗方式包括气囊扩张术, Heller肌切开术及经口内镜下肌切开术(per-oral endoscopic myotomy, POEM)的进展。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 贲门失弛缓症; 治疗; Heller肌切开; 经口内镜下肌切开术; 内镜下气囊扩张术

王爽, 刘冰熔. 贲门失弛缓症的研究进展. 世界华人消化杂志 2013; 21(1): 75-81

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/75.asp>

### 0 引言

贲门失弛缓症(achalasia)是以食管下段括约肌(lower esophageal sphincter, LES)松弛功能受损, 食管蠕动波减少或消失, 食管同步收缩为特征的罕见的原发性食管动力障碍性疾病。其每年患病率约为10/100 000, 发病率约为1/100 000<sup>[1,2]</sup>。本病的发生可能与食管肌间神经丛的自身免疫反应有关, 导致抑制神经元减少而无法拮抗兴奋性胆碱能神经元的作用, 从而引起胃食管连接部(gastroesophageal junction, GEJ)的功能性梗阻<sup>[3]</sup>。临床表现为吞咽困难、食物反流、胸骨后疼痛、体质量减轻、夜间咳嗽和烧心<sup>[4]</sup>。有上诉症状者, 通过钡透、胃镜检查、标准食管

### ■背景资料

贲门失弛缓症是一种罕见的原发性食管动力障碍性疾病, 以食管下段括约肌(LES)松弛功能受损, 食管蠕动波减少或消失, 食管同步收缩为特征。由于其发病机制仍不明确, 现有的治疗方式主要以缓解由LES引起的功能性梗阻为目的。目前主要的治疗方式包括气囊扩张术, 腹腔镜Heller肌切开术和经口内镜下肌切开术(POEM)。

### ■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)总医院消化内科

## ■ 研发前沿

目前,研究者通过各种途径寻找贲门失弛缓症安全有效的治疗方式,其中以POEM及寻找创伤性最小的Heller肌切开术为研究重点。POEM作为一种新的治疗方式,其长期疗效有待于观察。同时,如何预防治疗过度所致胃食管反流性疾病的发生有待进一步研究。

测压或高分辨率食管测压确诊为贲门失弛缓症<sup>[5-7]</sup>。目前,本病的发病机制仍不明确,所以现有的治疗方式主要以缓解由LES引起的功能性梗阻为目的。同时,治疗应基于以下两者之间的平衡:降低LES压力;预防可发展为Barrett's食管,甚至腺癌的胃食管返流性疾病(gastroesophageal reflux disease, GERD)的发生<sup>[8]</sup>。治疗方式包括药物治疗、介入治疗、手术治疗和中医整脊疗法。目前,最有效的治疗方式仍存在争议。本文就贲门失弛缓症的最新治疗进展作一综述,重点讨论贲门失弛缓症的主要治疗方式包括气囊扩张术, Heller肌切开术及经口内镜下肌切开术(peroral endoscopic myotomy, POEM)的进展。

## 1 药物治疗

**1.1 口服药物治疗** 目前,贲门失弛缓症的治疗没有特效药,口服药物治疗在贲门失弛缓症的现有治疗方式中疗效最差。常用的药物包括钙通道阻断剂与长效硝酸盐类<sup>[9]</sup>。硝酸盐类通过增加抑制神经递质(neurotransmitter, NO)使LES松弛<sup>[10]</sup>;钙通道阻滞剂通过抑制钙离子内流,从而抑制LES收缩<sup>[11]</sup>。两种药物均能降低LES压力,但是疗效短暂,作用效果有限,不良反应频繁发生(低血压、头痛和外周性水肿等)<sup>[12]</sup>,长期应用可耐药。因此,药物治疗主要为不能耐受有创治疗的患者保留或者作为确定治疗方式前的过渡治疗<sup>[13]</sup>。

**1.2 内镜下肉毒杆菌毒素注射(endoscopic botulinum toxin injection, EBTJ)** 严格地说,向LES注射肉毒杆菌毒素是一种药物治疗<sup>[5]</sup>。A型肉毒杆菌毒素(botulin toxin type A, BTA)被用于治疗贲门失弛缓症,其切割突触前膜的SNAP25分子,阻断乙酰胆碱的释放,从而阻断胆碱能神经支配,降低LES压<sup>[14]</sup>。研究表明单次EBTJ的临床有效期短,治疗后6 mo内有超过50%的患者复发<sup>[15]</sup>,然而对首次治疗有效的患者反复进行EBTJ后,两年内的有效率可达60%-85%<sup>[16]</sup>。与气囊扩张或手术治疗相比,EBTJ治疗缓解率低,复发率高<sup>[17]</sup>。近期研究显示,EBTJ与气囊扩张术结合治疗的有效率较单独气囊扩张术治疗高<sup>[18]</sup>。对EBTJ反应良好的因子包括强力型贲门失弛缓症、老年患者和LES压力不超过正常上限的50%<sup>[5]</sup>。而胸痛,年轻患者和收缩振幅>180 mmHg分别预测了EBTJ治疗的症状缓解期<6 mo<sup>[19]</sup>。研究指出BTA可以向周围肌肉及注射点远端扩散,出现构音困难等神经传导阻滞症状<sup>[20]</sup>,其发生率低。反

复EBTJ可致食管肌层与黏膜层黏连,增加手术治疗中穿孔的风险<sup>[21,22]</sup>。总之,EBTJ治疗安全,操作简单,有效期短,反复治疗致手术困难。目前EBTJ治疗主要为老年患者和有严重并存病的患者保留,亦可作为过渡治疗<sup>[23]</sup>。

## 2 介入治疗

**2.1 内镜下气囊扩张术(endoscopic pneumatic dilation, EPD)** 目前,EPD被认为是治疗贲门失弛缓症最有效的非手术治疗方式<sup>[20]</sup>。其原理是在试图保持黏膜完整的情况下,于胃食管连接部膨胀气囊,使肌纤维破裂,从而降低LES压力<sup>[24]</sup>。研究显示当EPD术后LES压力<10-15 mmHg时,患者的症状将得到长期缓解;而术后LES压力>20 mmHg时,超过45%的患者需要再次治疗<sup>[25]</sup>。EPD最严重的并发症是穿孔,其发生率<1%-3%<sup>[25]</sup>。在多次扩张中,首次扩张的穿孔率最高,特别是强力型贲门失弛缓症的患者<sup>[26]</sup>。这可能与首次加压过快过高致食管壁撕裂,气囊尖端遇阻时滑破变薄的食管下端及患者恶心呕吐时间间接增大的气囊压力有关<sup>[27]</sup>。另外,>65岁的患者在EPD中易穿孔<sup>[28]</sup>。当平均术后LES压力为9.66 mmHg时,患者会出现暂时的GERD的症状,其中胸痛是最常见的。EPD其他的并发症较少见,包括黏膜撕裂致胃肠道出血、食管壁血肿和误吸等<sup>[29]</sup>。EPD术后5年有效率为75%-90%<sup>[25]</sup>,单次EPD术后10年有效率为40%-60%<sup>[30]</sup>,研究显示反复进行EPD,可使其长期有效率≥90%<sup>[25]</sup>。同时,EPD术后的复发率与手术时患者的年龄相关,随着年龄的增加,复发率增高。在10-20岁的患者中,术后有90%需要再次治疗,而在>50岁的患者中不到30%的患者需要再次治疗<sup>[25]</sup>。EPD的优点包括门诊操作、疼痛轻微、术后第2天可正常工作,无反流或有轻微反流症状,可以在任何年龄甚至怀孕期间进行,手术费用较低<sup>[31]</sup>。目前,EPD是安全有效的治疗贲门失弛缓症的主要方式之一。

**2.2 暂时性自扩金属支架治疗(temporary self-expanding metallic stents therapy, TSMST)** TSMST是贲门失弛缓症的选择性治疗<sup>[32]</sup>。原理是在3-7 d内,金属支架在LES处缓慢展开,其释放的均匀压力使LES的肌组织较完全的断裂,以致LES压力下降<sup>[33]</sup>。与EPD相比,金属支架的扩张强度更为分散与持久,使LES的肌纤维更为均匀有效的撕裂,且术后疤痕较小,因此金属支架扩张可以得到较好的临床疗效及较低的复发率<sup>[33]</sup>。TSMST的主要并发症包括支架移位、穿孔、

出血及轻微的胸痛, 其发生率分别为6.0%、7.0%、6.0%及42.9%<sup>[33,34]</sup>。研究显示与直径为30 mm的气囊和直径分别为20 mm或25 mm的自扩金属支架相比, 应用直径为30 mm的自扩金属支架行TSMST后10年以上的临床缓解率较高为83.3%<sup>[35,36]</sup>。由于进行TSMST的患者较少, 研究者需要进行大量的临床对比研究, 以确定其有效性。

### 3 手术治疗

#### 3.1 Heller肌切术

**3.1.1 腹腔镜Heller肌切术(laparoscopic Heller myotomy, LHM):** 1913年, Heller首先提出应用食管肌切术治疗贲门失弛缓症。经过几十年的发展, Heller肌切术由开胸或开腹途径, 发展为微创胸腔镜或腹腔镜途径。由于单纯Heller肌切术术后反流的发生率高, 为减少反流, 现附加抗反流操作。目前, 腹腔镜Heller肌切术附加部分前壁胃底折叠术(dor anterior fundoplication)成为贲门失弛缓症的标准治疗方式<sup>[8,37]</sup>。LHM适合人群广, 其中超过60岁且能耐受手术的患者<sup>[38]</sup>及反复行EPD或反复行EBTJ治疗失败的患者, 在进行LHM后, 症状也可得到持久的缓解<sup>[39]</sup>。其简要经过为切断膈食管韧带, 暴露食管前壁, 水平方向切开食管纵形肌纤维约1 cm, 注意保留前壁迷走神经, 然后以Hook刀提起环形肌, 在不接触黏膜时切开环形肌。环形肌切开长度在贲门食管侧约为5-7 cm, 贲门胃侧约2 cm。在完成环形肌切开并检查没有黏膜穿孔后行胃底折叠术<sup>[40]</sup>。LHM在胃镜的引导下完成, 当肌切开段越过齿状线, 胃镜常规压力注气即可打开GEJ及胃镜容易通过贲门时, 进一步的肌切开将是多余的。因此, LHM没有过度肌切开风险<sup>[41]</sup>。根据Dor胃底折叠术, 将胃壁缝至肌切开的边缘, 保持肌切开处开放, 从而预防肌切开处组织的修复<sup>[42]</sup>。LHM使超过90%的患者得到症状的改善<sup>[43]</sup>。5年后, 仍有超过80%的患者没有吞咽困难的状况<sup>[44]</sup>, 10年后, 只有约三分之一的患者需要再次治疗<sup>[45]</sup>。LHM破坏了膈食管韧带, 改变了His角, 这两方面均可导致术后GERD的发生<sup>[46]</sup>。即使附加Dor胃底折叠术, 术后GERD的发生率仍为10%-30%<sup>[47]</sup>。长期GERD可发展为食管狭窄, Barrett's食管, 甚至腺癌<sup>[8]</sup>。在行Heller肌切术的12 721位患者的对比分析中, 3.04%的患者发展为食管癌<sup>[48]</sup>。因此, LHM附加Dor胃底折叠术后GERD的发生仍是急需解决的问题。LHM其他的并发症包括出

血、穿孔、神经损伤及发热, 其发生率均<2%, 且大多数并发症可在术中处理<sup>[49]</sup>。虽然LHM附加Dor胃底折叠术损伤较大, 住院时间较长, 但在多数患者中可取得良好的长期疗效<sup>[37,45]</sup>。目前, LHM附加Dor胃底折叠术被认为是贲门失弛缓症的一线治疗<sup>[50]</sup>。

**3.1.2 经内镜下Heller肌切术附加内镜下胃底折叠术(peroral endoscopic Heller myotomy plus endoscopic fundoplication, PEHMEF):** 2010年, Perretta等<sup>[51]</sup>对活体猪进行内镜下Heller肌切术, 通过胃镜建立食管黏膜下隧道, 切开食管肌层, 四周后行内镜下胃底折叠术。术后LES压力下降50%, 食管狭窄处直径增宽, 食管顺应性得到改善。内镜下胃底折叠术是GERD的治疗方式之一, 通过聚集部分胃贲门, 建立His角, 在聚集的皱褶处进行全层缝合, 延长胃食管瓣, 恢复GEJ的抗反流功能<sup>[52]</sup>。Witteman等<sup>[53]</sup>研究显示, 内镜下胃底折叠术, 没有明显改善食管的酸暴露, 手术3年后仍有较多患者需要药物或手术治疗。因此, PEHMEF需要进一步的临床研究以确定其临床疗效。

**3.1.3 机器人辅助的腹腔镜肌切术(robotically assisted laparoscopic Heller myotomy, RALHM):** 近期, 机器人远距外科进一步改善了LHM<sup>[54]</sup>。应用机器人后, LHM的许多限制得到改善, 如三维视角的利用度, 活动度的增加, 避免了支点效应等<sup>[55]</sup>。2005年研究显示RALHM与LHM有相同的有效性, 但是RALHM可以明显降低术中穿孔的发生<sup>[54]</sup>。然而, 在电灼牵引刀(Hook刀)应用于LHM后, 两者的安全性无明显差异<sup>[40]</sup>。近期研究显示RALHM术中并发症的发生率较LHM低, 但没有显著意义, 同时两者的平均手术时间没有明显差异<sup>[55]</sup>。由于RALHM手术费用高<sup>[56]</sup>, 其应用受到限制。

**3.1.4 经颈Heller肌切术(transcervical heller myotomy, THM):** 2010年, Spaun等<sup>[57]</sup>在十头活猪与两具人的尸体上应用可曲式内镜进行了THM。首先在胸骨上切迹开口, 于食管周围行气囊扩张建立组织通道, 再向膈食管连接处进行食管前壁或后壁的肌切开。THM在一个小且连续的组织通道中进行操作, 避开了血管和神经, 且术后通道快速消失。与LHM相比, THM损伤较小, 保留食管下段括约肌的支撑结构, 可能减少抗反流手术的需要。但与经食道途径相比, THM有较多损伤。目前THM处于原型研究阶段。

**3.2 经内镜下环形肌切术(per-oral endoscop-**

#### ■ 相关报道

许多国内外文献对贲门失弛缓症现有的主要治疗方式做了详细报道与对比研究, 分别从不同角度讲述各种治疗方式的优缺点。随着内镜医师技术的纯熟, POEM的研究文献逐渐增多, 并出现了有关POEM与腹腔镜Heller肌切术的对比报道。

### ■创新盘点

本文总结了贲门失弛缓症的最新治疗进展,包括国内外现处于研究阶段的各种新的治疗方法。本文重点讨论了气囊扩张术、腹腔镜Heller肌切开术与POEM治疗,并且对比了各种治疗方式的疗效、安全性、并发症以及适用人群等。

ic myotomy, POEM) 近期, POEM作为贲门失弛缓症的内镜手术治疗,以其创伤性最小的特点在世界范围内得到应用<sup>[58-60]</sup>。Rieder等<sup>[61]</sup>对比了LHM前后与POEM前后GEJ的膨胀性,结果显示进行全层肌切开的患者术后LES更加松弛,指出LES的部分支持可能来自纵形肌层。而POEM的基本目的在于切开食管内环形肌层及GEJ的套索纤维,保留完整的纵形肌层<sup>[60]</sup>。患者取仰卧位,在食管前壁2点钟方向进行环形肌切开术,避免对8点钟方向的His角的损伤,His角可能是抗反流的天然屏障<sup>[62]</sup>。因此POEM可以减少术后因LES松弛或His角的损伤所导致的GERD的发生。POEM的简要经过:首先,在距离GEJ约14 cm处,切开食管表面黏膜,形成一个纵形约2 cm的黏膜开口。然后,应用类似于内镜下黏膜下层剥离术(endoscopic sub-mucosal dissection, ESD)技术建立黏膜下层隧道,通过GEJ,到达近端胃约3 cm处。黏膜下层隧道的宽度约为食管周长的一半。在黏膜开口远端约3 cm处,即大约在GEJ上方10 cm处开始进行食管环形肌束的切开,至GEJ远端约2 cm处完成环形肌层的切开,最后应用止血夹关闭黏膜开口<sup>[63]</sup>。POEM适用于耐受手术的大多数贲门失弛缓症的患者,包括反复EPD失败、LHM失败或者POEM手术失败的患者<sup>[58]</sup>,儿科患者<sup>[64]</sup>以及S1型贲门失弛缓症(食管显著扩张和扭曲,CT层面鉴别有一个腔)的患者等<sup>[62]</sup>。对于S2型贲门失弛缓症(食管腔严重弯曲,CT层面鉴别有两个腔)的患者,简单行肌层切开不会减轻症状,进一步矫正食管弯曲是必要的<sup>[65]</sup>。POEM术中及术后的主要并发症包括皮下气肿和纵膈气肿,其发生率高,但不需附加手术,适当延长禁食时间即可<sup>[58]</sup>。POEM其他并发症包括气胸,迟发出血,胸腔积液,肺部炎症或肺叶不张及膈下积气,均可通过传统治疗解决,无需手术<sup>[66]</sup>。在Inoue等<sup>[62]</sup>, von Renteln等<sup>[60]</sup>和Zhou等<sup>[67]</sup>进行的POEM治疗中,没有严重的并发症发生,且短期疗效显著。POEM以内镜顺利通过GEJ以及退镜时GEJ的显著打开做为完整肌切开的指征,因此,其主要优势是可以控制术中肌切开的长度至完整的肌切开<sup>[58]</sup>。POEM的主要优点包括手术操作时间短,可短至39 min<sup>[68]</sup>;可以控制肌切开的长度和方向<sup>[58]</sup>。外科手术肌切开的最大长度为8 cm<sup>[69]</sup>,所以POEM更适用于需要延长肌切开长度的强力型贲门失弛缓症的患者。随访发现POEM术后有20%的患者出现GERD的症状,应用质子泵抑制剂反应良好<sup>[58]</sup>。综上所述,POEM作为

一种新的治疗方式,短期术后疗效显著,适用人群广,损伤小,术后恢复时间少,死亡率较LHM低<sup>[66]</sup>,并且可能减少医源性GERD的发生。由于POEM对术者ESD技术水平要求高,目前在世界范围内开展较少。但随着内镜医师技术的纯熟,POEM可能成为治疗贲门失弛缓症的金标准<sup>[62]</sup>。

## 4 中医整脊疗法

高月等<sup>[70]</sup>在10例诊断为贲门失弛缓症的患者X片中发现,颈胸交界部位出现侧弯,并伴有小关节紊乱,主要在C6-T6之间,尤以T2、T3、T4错位明显。故采用整脊法进行错位矫正,扩大椎间孔,解除或改善对交感神经的牵张或压迫,使植物神经达到新的平衡,从而缓解贲门括约肌的痉挛失弛缓状态。

## 5 结论

贲门失弛缓症的治疗包括药物治疗,介入治疗,手术治疗及中医整脊疗法。药物治疗疗效短暂,频发副作用,目前主要应用于老年患者及不能耐受手术有严重并存病的患者。TSMST、PEHMEF、RALHM、THM及中医整脊疗法的临床有效性有待于进一步研究。目前较主要的治疗方式为EPD、LHM和POEM手术。EPD的优点包括门诊操作,损伤最小,最小疼痛,第2天可恢复工作,GERD发生率低,且在任何年龄甚至怀孕期间也可以进行<sup>[31]</sup>。但是EPD最严重的并发症是穿孔,发生率<1%-3%<sup>[25]</sup>。虽然LHM穿孔率较EPD高<sup>[71]</sup>,但大部分穿孔在术中得以发现并解决。与EPD相比,LHM附加Dor胃底折叠术损伤较大,术后恢复时间较长,术后GERD发生率较高,为10%-30%,但其术后症状缓解时间较长,是目前治疗贲门失弛缓症的金标准<sup>[47]</sup>。POEM作为一种新的治疗方式,短期术后疗效显著。与LHM相比,POEM适用人群较广,损伤较小,术后恢复时间较短,死亡率较低,无严重并发症,术后GERD发生率较低。POEM还可以避免EPD术中不可预知及不可控制的穿孔的发生<sup>[62]</sup>。然而由于POEM技术非常新颖,其远期疗效仍然未知,需要长期的观察及对比研究才能确定其在治疗贲门失弛缓症中的地位。但是可以预测,POEM有望成为治疗贲门失弛缓症的金标准。

## 6 参考文献

- 1 Omura N, Kashiwagi H, Yano F, Tsuboi K, Yanaga K. Reoperations for esophageal achalasia. *Surg Today* 2012; 42: 1078-1081 [PMID: 22790707 DOI:

- 10.1007/s00595-012-0204-y.]
- 2 Abu Gazala M, Khalaila A, Shussman N, Abu Gazala S, Elazary R, Amar D, Kushnir D, Ponomernco O, Zamir G, Rivkind AI, Mintz Y. Transesophageal endoscopic myotomy for achalasia: recognizing potential pitfalls before clinical application. *Surg Endosc* 2012; 26: 681-687 [PMID: 21993936]
  - 3 Gockel HR, Schumacher J, Gockel I, Lang H, Haaf T, Nöthen MM. Achalasia: will genetic studies provide insights? *Hum Genet* 2010; 128: 353-364 [PMID: 20700745 DOI: 10.1007/s00439-010-0874-8.]
  - 4 Vaezi MF, Richter JE. Diagnosis and management of achalasia. American College of Gastroenterology Practice Parameter Committee. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 3406-3412 [PMID: 10606295 DOI: 10.1016/S0002-9270(99)00698-X.]
  - 5 Eckardt AJ, Eckardt VF. Treatment and surveillance strategies in achalasia: an update. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8: 311-319 [PMID: 21522116 DOI: 10.1038/nrgastro.2011.68.]
  - 6 Gutschow CA, Töx U, Leers J, Schäfer H, Prenzel KL, Hölscher AH. Botox, dilation, or myotomy? Clinical outcome of interventional and surgical therapies for achalasia. *Langenbecks Arch Surg* 2010; 395: 1093-1099 [PMID: 20845045 DOI: 10.1007/s00423-010-0711-5.]
  - 7 Pandolfino JE, Roman S. High-resolution manometry: an atlas of esophageal motility disorders and findings of GERD using esophageal pressure topography. *Thorac Surg Clin* 2011; 21: 465-475 [PMID: 22040629 DOI: 10.1016/j.thorsurg.2011.08.007.]
  - 8 Bello B, Herbella FA, Patti MG. Evolution of the minimally invasive treatment of esophageal achalasia. *World J Surg* 2011; 35: 1442-1446 [PMID: 21400015 DOI: 10.1007/s00268-011-1027-5.]
  - 9 Hoogerwerf WA, Pasricha PJ. Pharmacologic therapy in treating achalasia. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2001; 11: 311-324, vii [PMID: 11319064]
  - 10 Lake JM, Wong RK. Review article: the management of achalasia - a comparison of different treatment modalities. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 909-918 [PMID: 16948803 DOI: 10.1111/j.1365-2036.2006.03079.x.]
  - 11 Bortolotti M. Medical therapy of achalasia: A benefit reserved for few. *Digestion* 1999; 60: 11-16 [PMID: 9892793 DOI: 10.1159/000007583.]
  - 12 Annese V, Bassotti G. Non-surgical treatment of esophageal achalasia. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5763-5766 [PMID: 17007039]
  - 13 Adler DG, Romero Y. Primary esophageal motility disorders. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 195-200 [PMID: 11213308 DOI: 10.1016/S0025-6196(11)63127-3.]
  - 14 Dressler D, Adib Saberi F. Botulinum toxin: mechanisms of action. *Eur Neurol* 2005; 53: 3-9 [PMID: 15650306]
  - 15 Zaninotto G, Annese V, Costantini M, Del Genio A, Costantino M, Epifani M, Gatto G, D'onofrio V, Benini L, Contini S, Molena D, Battaglia G, Tardio B, Andriulli A, Ancona E. Randomized controlled trial of botulinum toxin versus laparoscopic heller myotomy for esophageal achalasia. *Ann Surg* 2004; 239: 364-370 [PMID: 15075653 DOI: 10.1097/01.sla.0000114217.52941.c5.]
  - 16 Annese V, Bassotti G, Coccia G, Dinelli M, D'Onofrio V, Gatto G, Leandro G, Repici A, Testoni PA, Andriulli A. A multicentre randomised study of intrasphincteric botulinum toxin in patients with oesophageal achalasia. GISMAD Achalasia Study Group. *Gut* 2000; 46: 597-600 [PMID: 10764700 DOI: 10.1136/gut.46.5.597.]
  - 17 Wang L, Li YM, Li L. Meta-analysis of randomized and controlled treatment trials for achalasia. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 2303-2311 [PMID: 19107596 DOI: 10.1007/s10620-008-0637-8.]
  - 18 Bakhshipour A, Rabbani R, Shirani S, Soleimani HA, Mikaeli J. Comparison of pneumatic dilation with pneumatic dilation plus botulinum toxin for treatment of achalasia. *Acta Med Iran* 2010; 48: 107-110
  - 19 Porter RF, Gyawali CP. Botulinum toxin injection in dysphagia syndromes with preserved esophageal peristalsis and incomplete lower esophageal sphincter relaxation. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23: 139-144, e27-e28 [PMID: 20939855 DOI: 10.1111/j.1365-2982.2010.01604.x.]
  - 20 Galassi G, Orlandi C, Valzania F, Albertini G, Barbieri A. Botulin toxin type A (BTA) for esophageal achalasia: a double-edged sword. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26: 1079-1080 [PMID: 21052699]
  - 21 Torquati A, Richards WO, Holzman MD, Sharp KW. Laparoscopic myotomy for achalasia: predictors of successful outcome after 200 cases. *Ann Surg* 2006; 243: 587-591; discussion 591-593 [PMID: 16632992 DOI: 10.1097/01.sla.0000216782.10502.47.]
  - 22 Vela MF, Richter JE, Wachsberger D, Connor J, Rice TW. Complexities of managing achalasia at a tertiary referral center: use of pneumatic dilatation, Heller myotomy, and botulinum toxin injection. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1029-1036 [PMID: 15180721]
  - 23 Fovos A, Jarral O, Patel V, Podas T, Spalding D, Zacharakis E. Does Heller's myotomy provide superior clinical outcome in comparison to botulinum toxin injection for treatment of achalasia?: Best evidence topic (BET). *Int J Surg* 2012; 10: 120-123 [PMID: 22327009 DOI: 10.1016/j.ijsu.2012.01.008.]
  - 24 Eckardt VF, Gockel I, Bernhard G. Pneumatic dilation for achalasia: late results of a prospective follow up investigation. *Gut* 2004; 53: 629-633 [PMID: 15082578 DOI: 10.1136/gut.2003.029298.]
  - 25 Hulselmans M, Vanuytsel T, Degreef T, Sifrim D, Coosemans W, Lerut T, Tack J. Long-term outcome of pneumatic dilation in the treatment of achalasia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8: 30-35 [PMID: 19782766 DOI: 10.1016/j.cgh.2009.09.020.]
  - 26 Lopushinsky SR, Urbach DR. Pneumatic dilatation and surgical myotomy for achalasia. *JAMA* 2006; 296: 2227-2233 [PMID: 17090769 DOI: 10.1001/jama.296.18.2227.]
  - 27 杨艳, 于皆平, 李欢, 曹俊, 于红刚. 内镜下气囊扩张治疗贲门失弛缓症81例. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1024-1026
  - 28 Vanuytsel T, Lerut T, Coosemans W, Vanbeckevoort D, Blondeau K, Boeckxstaens G, Tack J. Conservative management of esophageal perforations during pneumatic dilation for idiopathic esophageal achalasia. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10: 142-149 [PMID: 22064041 DOI: 10.1016/j.cgh.2011.10.032.]
  - 29 Tuset JA, Luján M, Huguet JM, Canelles P, Medina E. Endoscopic pneumatic balloon dilation in primary achalasia: predictive factors, complications, and long-term follow-up. *Dis Esophagus* 2009; 22: 74-79 [PMID: 19021691 DOI: 10.1111/j.1442-2050.2008.00874.x.]
  - 30 Chan KC, Wong SK, Lee DW, Mui WL, Chan AC,

### ■应用要点

本文较详细的讲述并对比了各种治疗方式的疗效、安全性、并发症以及适用人群等,能够较好的指导医师根据患者病情选择最佳治疗方式,具有重要的临床指导意义。

### ■名词解释

强有力型贲门失弛缓症:有相对高的食管收缩幅度,食管扩张最小,且在X线片上有显著的第三收缩波,临床表现有胸痛感。

- Ng EK, Wu JC, Sung JJ, Chung SC. Short-term and long-term results of endoscopic balloon dilatation for achalasia: 12 years' experience. *Endoscopy* 2004; 36: 690-694 [PMID: 15280973 DOI: 10.1055/s-2004-825659.]
- 31 Richter JE, Boeckstaens GE. Management of achalasia: surgery or pneumatic dilation. *Gut* 2011; 60: 869-876 [PMID: 21303915 DOI: 10.1136/gut.2010.212423.]
- 32 Cheng YS, Ma F, Li YD, Chen NW, Chen WX, Zhao JG, Wu CG. Temporary self-expanding metallic stents for achalasia: a prospective study with a long-term follow-up. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 5111-5117 [PMID: 20976849 DOI: 10.3748/wjg.v16.i40.5111.]
- 33 Zhu YQ, Cheng YS, Tang GY, Li MH, Zhao JG, Li F. Comparison of temporary stent insertion with pneumatic dilation of the same diameter in the treatment of achalasia patients: a retrospective study. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 499-505 [PMID: 20074159 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.06107.x.]
- 34 Schoppmann SF, Langer FB, Prager G, Zacherl J. Outcome and complications of long-term self-expanding esophageal stenting. *Dis Esophagus* 2012 Mar 12. [Epub ahead of print] [PMID: 22409454 DOI: 10.1111/j.1442-2050.2012.01337.x.]
- 35 Li YD, Tang GY, Cheng YS, Chen NW, Chen WX, Zhao JG. 13-year follow-up of a prospective comparison of the long-term clinical efficacy of temporary self-expanding metallic stents and pneumatic dilatation for the treatment of achalasia in 120 patients. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 195: 1429-1437 [PMID: 21098206]
- 36 朱悦琦, 程英升, 李明华, 赵俊功, 李烽. 暂时性贲门支架置入与球囊扩张治疗贲门失弛缓症患者的比较研究. 介入放射学杂志 2011; 20: 700-705
- 37 Kaman L, Iqbal J, Kochhar R, Sinha S. Laparoscopic Heller Myotomy for Achalasia Cardia-Initial Experience in a Teaching Institute. *Indian J Surg* 2012 July 31 [DOI: 10.1007/s12262-012-0708-0.]
- 38 Roll GR, Ma S, Gasper WJ, Patti M, Way LW, Carter J. Excellent outcomes of laparoscopic esophagomyotomy for achalasia in patients older than 60 years of age. *Surg Endosc* 2010; 24: 2562-2566 [PMID: 20361213 DOI: 10.1007/s00464-010-1003-4.]
- 39 Finley CJ, Kondra J, Clifton J, Yee J, Finley R. Factors associated with postoperative symptoms after laparoscopic Heller myotomy. *Ann Thorac Surg* 2010; 89: 392-396 [PMID: 20103306 DOI: 10.1016/j.athoracsur.2009.10.046.]
- 40 Roller JE, de la Fuente SG, DeMaria EJ, Pryor AD. Laparoscopic Heller myotomy using hook electrocautery: a safe, simple, and inexpensive alternative. *Surg Endosc* 2009; 23: 602-605 [PMID: 18622538]
- 41 Ross S, Villadolid D, Al-Saadi S, Boyle R, Cowgill SM, Rosemurgy A. After laparoscopic Heller myotomy, do emergency department visits or readmissions predict poor long-term outcomes? *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 2125-2132 [PMID: 18854961 DOI: 10.1007/s11605-008-0707-4.]
- 42 Porziella V, Cesario A, Granone P. Dor fundoplication after myotomy for achalasia: useful, unnecessary, or harmful? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 132: 216-217; author reply 217 [PMID: 16798361 DOI: 10.1016/j.jtcvs.2006.02.031.]
- 43 Rosemurgy AS, Morton CA, Rosas M, Albrink M, Ross SB. A single institution's experience with more than 500 laparoscopic Heller myotomies for achalasia. *J Am Coll Surg* 2010; 210: 637-645, 645-647 [PMID: 20421021 DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2010.01.035.]
- 44 Bessell JR, Lally CJ, Schlothe A, Jamieson GG, Devitt PG, Watson DI. Laparoscopic cardiomyotomy for achalasia: long-term outcomes. *ANZ J Surg* 2006; 76: 558-562 [PMID: 16813618 DOI: 10.1111/j.1445-2197.2006.03784.x.]
- 45 Richter JE. Recent research on pneumatic dilatation versus laparoscopic heller myotomy for achalasia treatment. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 2012; 8: 330-332 [PMID: 22933866]
- 46 Campos GM, Vittinghoff E, Rabl C, Takata M, Gadenstätter M, Lin F, Ciovica R. Endoscopic and surgical treatments for achalasia: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg* 2009; 249: 45-57 [PMID: 19106675 DOI: 10.1097/SLA.0b013e31818e43ab.]
- 47 Tsiaoussis J, Pechlivanides G, Gouvas N, Athanasakis E, Zervakis N, Manitides A, Xynos E. Patterns of esophageal acid exposure after laparoscopic Heller's myotomy and Dor's fundoplication for esophageal achalasia. *Surg Endosc* 2008; 22: 1493-1499 [PMID: 18095027 DOI: 10.1007/s00464-007-9681-2.]
- 48 Biswanath P, GoudaThomas Nelson. Sunil Bhojru. Revisional Surgery after Heller Myotomy for Treatment of Achalasia: A Comparative Analysis Focusing on Operative Approach. *Indian J Surg* 2012; 74: 309-313 [DOI 10.1007/s12262-011-0402-7]
- 49 Zaninotto G, Costantini M, Rizzetto C, Zanatta L, Guirroli E, Portale G, Nicoletti L, Cavallin F, Battaglia G, Ruol A, Ancona E. Four hundred laparoscopic myotomies for esophageal achalasia: a single centre experience. *Ann Surg* 2008; 248: 986-993 [PMID: 19092343 DOI: 10.1097/SLA.0b013e3181907bdd.]
- 50 Pontone S, Urciuoli P, Pontone P, Custureri F. Dor against toupet fundoplication after heller myotomy. Laparoscopic technical improvements and endoscopic support. *J Gastrointest Surg* 2011; 15: 2119-2120 [PMID: 21720927 DOI: 10.1007/s11605-011-1603-x.]
- 51 Perretta S, Dallemagne B, Allemann P, Marescaux J. Multimedia manuscript. Heller myotomy and intraluminal fundoplication: a NOTES technique. *Surg Endosc* 2010; 24: 2903 [PMID: 20428893]
- 52 Repici A, Fumagalli U, Malesci A, Barbera R, Gambaro C, Rosati R. Endoluminal fundoplication (ELF) for GERD using EsophyX: a 12-month follow-up in a single-center experience. *J Gastrointest Surg* 2010; 14: 1-6 [PMID: 19902310]
- 53 Witteman BP, Strijkers R, de Vries E, Toemen L, Conchillo JM, Hameeteman W, Dagnelie PC, Koek GH, Bouvy ND. Transoral incisionless fundoplication for treatment of gastroesophageal reflux disease in clinical practice. *Surg Endosc* 2012; 26: 3307-3315 [PMID: 22648098 DOI: 10.1007/s00464-012-2324-2.]
- 54 Melvin WS, Dundon JM, Talamini M, Horgan S. Computer-enhanced robotic telesurgery minimizes esophageal perforation during Heller myotomy. *Surgery* 2005; 138: 553-558; discussion 553-558; [PMID: 16269282 DOI: 10.1016/j.surg.2005.07.025.]
- 55 Sánchez A, Rodríguez O, Nakkal E, Davila H, Valero R, Sánchez R, Pena R, Visconti M F. Robotic-assisted Heller myotomy versus laparoscopic Heller myotomy for the treatment of esophageal achalasia: a case-control study. *Journal of Robotic Surgery* 2012; 6: 213-216 [DOI: 10.1007/s11701-011-0294-3]
- 56 Shaligram A, Unniravi J, Simorov A, Kothari VM, Oleynikov D. How does the robot affect outcomes?

A retrospective review of open, laparoscopic, and robotic Heller myotomy for achalasia. *Surg Endosc* 2012; 26: 1047-1050 [PMID: 22038167 DOI: 10.1007/s00464-011-1994-5.]

57 Spaun GO, Dunst CM, Arnold BN, Martinec DV, Cassera MA, Swanström LL. Transcervical heller myotomy using flexible endoscopy. *J Gastrointest Surg* 2010; 14: 1902-1909 [PMID: 20721635 DOI: 10.1007/s11605-010-1290-z.]

58 Eleftheriadis N, Inoue H, Ikeda H, Onimaru M, Yoshida A, Hosoya T, Maselli R, Kudo SE. Training in peroral endoscopic myotomy (POEM) for esophageal achalasia. *Ther Clin Risk Manag* 2012; 8: 329-342 [PMID: 22888256 DOI: 10.2147/TCRM.S32666.]

59 Inoue H, Kudo SE. [Per-oral endoscopic myotomy (POEM) for 43 consecutive cases of esophageal achalasia]. *Nihon Rinsho* 2010; 68: 1749-1752 [PMID: 20845759]

60 von Renteln D, Inoue H, Minami H, Werner YB, Pace A, Kersten JF, Much CC, Schachschal G, Mann O, Keller J, Fuchs KH, Rösch T. Peroral endoscopic myotomy for the treatment of achalasia: a prospective single center study. *Am J Gastroenterol* 2012; 107: 411-417 [PMID: 22068665 DOI: 10.1038/ajg.2011.388.]

61 Rieder E, Swanström LL, Perretta S, Lenglinger J, Riegler M, Dunst CM. Intraoperative assessment of esophagogastric junction distensibility during peroral endoscopic myotomy (POEM) for esophageal motility disorders. *Surg Endosc* 2012 Sep 6. [Epub ahead of print] [PMID: 22955896 DOI: 10.1007/s00464-012-2484-0.]

62 Inoue H, Minami H, Kobayashi Y, Sato Y, Kaga M, Suzuki M, Satodate H, Odaka N, Itoh H, Kudo S. Peroral endoscopic myotomy (POEM) for esophageal achalasia. *Endoscopy* 2010; 42: 265-271 [PMID: 20354937 DOI: 10.1055/s-0029-1244080.]

63 Ponsky JL, Marks JM, Pauli EM. How i do it: peroral endoscopic myotomy (POEM). *J Gastrointest Surg* 2012; 16: 1251-1255 [PMID: 22450949]

64 Maselli R, Inoue H, Misawa M, Ikeda H, Hosoya T, Onimaru M, Yoshida A, Eleftheriadis N, Suzuki K, Kudo S. Peroral endoscopic myotomy (POEM) in a 3-year-old girl with severe growth retardation, achalasia, and Down syndrome. *Endoscopy* 2012; 44 Suppl 2 UCTN: E285-E287 [PMID: 22933258 DOI: 10.1055/s-0032-1309924.]

65 Inoue H, Tianle KM, Ikeda H, Hosoya T, Onimaru M, Yoshida A, Minami H, Kudo SE. Peroral endoscopic myotomy for esophageal achalasia: technique, indication, and outcomes. *Thorac Surg Clin* 2011; 21: 519-525 [PMID: 22040634 DOI: 10.1016/j.thorsurg.2011.08.005.]

66 Ren Z, Zhong Y, Zhou P, Xu M, Cai M, Li L, Shi Q, Yao L. Perioperative management and treatment for complications during and after peroral endoscopic myotomy (POEM) for esophageal achalasia (EA) (data from 119 cases). *Surg Endosc* 2012; 26: 3267-3272 [PMID: 22609984 DOI: 10.1007/s00464-012-2336-y.]

67 Zhou PH, Cai MY, Yao LQ, Zhong YS, Ren Z, Xu MD, Chen WF, Qin XY. [Peroral endoscopic myotomy for esophageal achalasia: report of 42 cases]. *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2011; 14: 705-708 [PMID: 21948538]

68 Zhou PH, Cai MY, Yao LQ, Zhong YS, Ren Z, Xu MD, Qin XY. Peroral Endoscopic Myotomy for Esophageal Achalasia by HybridKnife: A Case Report. *Case Rep Gastrointest Med* 2012; 2012: 325479 [PMID: 22900214 DOI: 10.1155/2012/325479.]

69 Woltman TA, Pellegrini CA, Oelschlager BK. Achalasia. *Surg Clin North Am* 2005; 85: 483-493 [PMID: 15927645]

70 高月, 高明. 整脊疗法治疗贲门失弛缓症10例. *按摩与导引* 2007; 2: 14-15

71 Weber CE, Davis CS, Kramer HJ, Gibbs JT, Robles L, Fisichella PM. Medium and long-term outcomes after pneumatic dilation or laparoscopic Heller myotomy for achalasia: a meta-analysis. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2012; 22: 289-296 [PMID: 22874676]

**同行评价**  
 本文较全面的综述了贲门失弛缓症的最新治疗进展,指出了各种治疗方式的优缺点,引用文献较新,对临床工作有一定参考价值。

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

《世界华人消化杂志》于 2012-12-26 获得 RCCSE 中国权威学术期刊 (A+) 称号

本刊讯 《世界华人消化杂志》在第三届中国学术期刊评价中被武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)评为“RCCSE中国权威学术期刊(A+)”。本次共有6 448种中文学术期刊参与评价,计算出各刊的最终得分,并将期刊最终得分按照从高到低依次排列,按照期刊在学科领域中的得分划分到A+、A、A-、B+、B、C级6个排名等级范围。其中A+(权威期刊)取前5%; A(核心期刊)取前5%-20%; A-(扩展核心期刊)取前20%-30%; B+(准核心期刊)取前30%-50%; B(一般期刊)取前50%-80%; C(较差期刊)为80%-100%。(《世界华人消化杂志》编辑部)





# 挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿的应用进展

陈琴, 王晓锋, 李华山

## ■背景资料

肛管直肠周围脓肿又称肛周脓肿, 以往大多采用分期手术, 但分期手术患者痛苦较大, 因后遗症肛瘘, 经久不愈, 多次住院增加患者经济负担. 随着挂线疗法的临床运用, 在提高根治率的同时, 较好地保护了肛门功能, 日益受到临床医师的喜爱.

陈琴, 王晓锋, 李华山, 中国中医科学院广安门医院肛肠科北京市 100053

陈琴, 硕士, 主要从事肛肠疾病的防治与研究.

作者贡献分布: 本文选题设计及审校由李华山完成; 文献资料搜集由陈琴与王晓锋共同完成; 写作由陈琴完成.

通讯作者: 李华山, 主任医师, 100053, 北京市西城区北线阁街5号, 中国中医科学院广安门医院肛肠科. lihuashan@263.net

电话: 010-88001025 传真: 010-63014195

收稿日期: 2012-10-11 修回日期: 2012-11-15

接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2013-01-08

## Progress in the use of thread-drawing therapy of perianorectal abscess

Qin Chen, Xiao-Feng Wang, Hua-Shan Li

Qin Chen, Xiao-Feng Wang, Hua-Shan Li, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China  
Correspondence to: Hua-Shan Li, Chief Physician, Department of Proctology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, 5 Beixiang Street, Xicheng District, Beijing 100053, China. lihuashan@263.net  
Received: 2012-10-11 Revised: 2012-11-15  
Accepted: 2012-12-20 Published online: 2013-01-08

## Abstract

Perianorectal abscess is a frequently encountered clinical condition. The main treatment is surgery. A staged procedure, consisting of simple incision/drainage and second-stage surgery when fistula-in-ano is formed, is often used in the past. Staged surgery has obvious disadvantages because patients have to undergo two operations and have a heavy economic burden. Thread-drawing therapy has been introduced in China since 1950s. The mechanisms behind therapeutic effects of thread-drawing therapy include chronic cutting action, foreign body stimulation, drainage, and marking. There are three types of thread-drawing therapy available: cutting thread-drawing therapy, loose thread-drawing drainage, and thread-drawing therapy combined with other therapies. The key points of the application of thread-drawing therapy include: accurate identification and management of internal opening (infected anal gland), understanding of the indications of cutting thread-drawing

therapy and loose thread-drawing drainage, and the tightness of the thread. Compared to staged surgery, thread-drawing therapy can greatly reduce the occurrence of anal fistula and protect anal function.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Perianorectal abscess; Thread-drawing therapy; Research progress

Chen Q, Wang XF, Li HS. Progress in the use of thread-drawing therapy of perianorectal abscess. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 82-86

## 摘要

肛管直肠周围脓肿为临床常见多发病, 其治疗主要以手术为主, 以往大多采用分期手术, 即一期先切开引流, 待形成肛瘘后再行二期手术, 这种术式明显的缺点在于患者需承受两次手术之苦, 经济负担也较重. 20世纪50年代起, 国内开始倡导肛管直肠周围脓肿的根治术式, 引入了挂线疗法, 其作用机理为: (1)慢性切割作用; (2)异物刺激作用; (3)引流作用; (4)标志作用. 挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿归纳起来可以分为挂实线、挂虚线及挂线配合其他疗法. 应用挂线疗法的关键要点为: 正确寻找和处理内口(感染的肛腺); 掌握挂实线和挂虚线的应用指征; 注意紧线的问题. 至今, 该疗法在临床运用已30余年, 与传统的单纯切开引流术相比, 不仅大大减少了后遗症肛瘘的发生, 还极大程度地保护了肛门功能.

© 2013年版权归Baishideng所有.

关键词: 肛管直肠周围脓肿; 挂线疗法; 应用进展

陈琴, 王晓锋, 李华山. 挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿的应用进展. *世界华人消化杂志* 2013; 21(1): 82-86  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/82.asp>

## 0 引言

挂线疗法是中医外治法中传统的治疗方法之一, 最初是用于肛瘘的治疗, 为保留肛门括约肌功能而设. 将挂线疗法用于肛管直肠周围脓肿的

■同行评议者  
王正康, 教授, 中日友好医院普外科

治疗,同样较好地保护了肛门功能,并减少了后遗症的发生,提高了根治率.目前,临床医师普遍采用这一疗法,积累了丰富的临床经验.现将近30年来挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿的应用情况及进展综述如下.

### 1 挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿的起源

肛管直肠周围脓肿的传统手术方式为分期手术,即一期切开引流,待炎症消退,形成肛瘘时再行二期根治手术.此种术式最大的弊端为患者痛苦大,增加二次住院的经济负担.其复发和形成肛瘘的比率为42%-65%<sup>[1]</sup>.为减少脓肿复发和肛瘘的发生,国内曹吉勋<sup>[2]</sup>于20世纪50年代开始对肛管直肠周围脓肿的一期根治术进行了研究.此后,临床学者积极探索,引入了挂线疗法.辽宁中医药大学附属肛肠医院于20世纪70年代开展切开挂线术治疗肛管直肠周围脓肿以来,共诊治肛管直肠周围脓肿患者6 000余例,随访3 000余例,其近期治愈率达99.7%,远期治愈率达96.9%,后遗症仅为3.1%.

### 2 挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿的理论基础及适应症

肛肠感染学说是目前肛管直肠周围脓肿公认的发病学说.从病理学来讲,其发病过程可分为4个阶段:(1)肛窦炎;(2)肛门直肠周围炎;(3)肛门直肠周围脓肿;(4)肛瘘.因此,肛管直肠周围脓肿和肛瘘实际上是同一种疾病的两个不同发展阶段.采用挂线治疗肛瘘,实际上即通过紧线或弹性收缩,以线代刀,在被挂组织局部产生压迫性缺血坏死而缓慢分离,同时由于线或橡皮筋的异物刺激作用,在局部产生炎症反应引起纤维化而形成纤维结缔组织.胡伯虎等<sup>[3]</sup>于1983年通过动物实验研究将挂线疗法的作用机理归纳为以下4个方面:(1)慢性勒割作用;(2)异物刺激作用;(3)引流作用;(4)标志作用.至今,临床学者对挂线疗法4个方面的作用机制研究得更为清楚.张琳等<sup>[4]</sup>认为,人体组织对损伤的修复几乎同步发生,是矛盾统一体;当致损因子强度大、持续时间长时,以损伤为主要表现;当致损因子强度减弱或消除时,则以修复为主要表现.根据创伤修复的现代概念可知<sup>[5]</sup>,挂线的创伤或异物刺激机体所形成的纤维结缔组织是由胶原和少量间质组成.胶原的合成以第1-2周最快,第3-4周沉积,并且随着时间推移,胶原的交联作用增强,创口抗张强度也提高.也就是说要使自控

肌层断端形成足量的纤维结缔组织,使之得到有效的固定,至少需要2 wk时间.

因此,可以说采用挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿是挂线治疗肛瘘作用的延伸,其要点就在于利用线的引流作用,将感染源(内口)彻底清除,以所挂之线缓慢切割肛管直肠环,使肛周不至于缺损较大,所以准确寻找和正确处理内口,彻底清除感染的原发病灶,保证引流通畅,是治愈肛周脓肿预防后遗症的关键<sup>[6]</sup>.有部分复杂性脓肿在急性炎症期,因内口暂时闭合,寻找较困难.若强行寻找,很可能形成假道,此种情况不可强行挂线.挂线疗法主要适用于肛提肌以上的脓肿.临床运用时,需严格把握适应症.

### 3 挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿的具体运用

挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿具体可以分为挂实线、挂虚线及挂线配合其他疗法,现分述如下.

3.1 挂实线 挂实线(实挂)的典型术式是低位切开、高位挂线法,实际上即为切开挂线术<sup>[7]</sup>.20世纪90年代以前,我国主要运用的是紧线挂线法(实挂)<sup>[8]</sup>.国外将实挂称为“cutting seton”.该术式主要强调挂线疗法的慢性切割和异物刺激作用,与单纯切开引流术相比,有效地保护了肛门功能,避免了完全性肛门失禁的发生.目前,临床医师普遍采用切开挂线术,报道的治愈率一般在95%以上,其复发率较单纯切开引流术大大减少.郑芳<sup>[9]</sup>采用切开挂线术治疗128例高位马蹄形肛管直肠周围脓肿,治愈率达95.3%,经1年门诊复查或电话随访122例无复发,无畸形、缺损及肛门失禁,肛门功能正常.王鑫等<sup>[10]</sup>报道采用切开挂线术治疗高位直肠周围脓肿316例,全部治愈,肛门无明显瘢痕形成,其中94例患者经5 mo-3年的随访,未出现脓肿复发和肛瘘形成.吕飞跃等<sup>[11]</sup>采用一期切开引流加挂线术治疗肛管直肠周围脓肿308例,一次性临床治愈303例(占98.4%),术后随访5年,仅有5例(占1.6%,其中肛管周围脓肿3例,坐骨直肠窝脓肿2例)复发.其他临床报道<sup>[12-14]</sup>也都取得了较好的治疗效果.

随着临床研究的逐步深入,部分学者发现切开挂线术还是存在一定的不足,如:有学者<sup>[15]</sup>认为传统的高位橡皮筋挂线虽可避免完全性肛门失禁,但毕竟会将肛肠环勒断,而造成部分缺损,影响其括约功能,术后大部分患者排气及控制排便功能下降,出现稀便不易控制的轻度肛门失禁现象.黄乃健<sup>[16]</sup>将切割挂线的不足总结为:

#### ■研究前沿

采用挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿,解决了直接切开而导致肛门失禁的问题.挂线方式有挂实线、挂虚线及挂线配合其他疗法.但挂线疗法的适应症、禁忌证与操作要点等尚需进一步规范.

#### ■相关报道

王鑫等报道采用切开挂线术治疗高位直肠周围脓肿316例,全部治愈,肛门无明显瘢痕形成,其中94例患者经5 mo-3年的随访,未出现脓肿复发和肛瘘形成.

### ■创新盘点

本文对挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿进行了详细阐述,肯定了挂线疗法的优势,指出挂线疗法仍然存在一些不足,今后需进一步规范挂线疗法的操作要点。

(1)组织结扎在橡皮筋内,疼痛较重,往往持续24 h或更久;(2)应用药线虽然疼痛较轻,但往往需要紧线或切除残余的纤维结缔组织,从而增加患者痛苦;(3)有异物感;(4)分泌物多,不易清洁;(5)创面愈合时间长;(6)挂线处可遗留明显凹陷。针对切开挂线术存在的不足,部分学者尝试作了一些改进,如:吴泽炎<sup>[17]</sup>报道运用切开清创引流挂线术,即先行切开引流术,1-2 wk后再行清创挂线术,与切开挂线术相比,避免了急性炎症期炎性组织受到挂线持续创伤刺激而引起的术后疼痛剧烈;以及脓腔宽大,挂线部位难以准确判定,盲目挂线可能引起疗效不佳等方面的问题。蒋进广等<sup>[18]</sup>在切开挂线引流术的基础上进行改良,要点为:“八”形结扎切除内口两侧的黏膜组织,扩大切除隐性感染灶,挂线没有挂在脓腔最高位。陈玉根<sup>[19]</sup>提出一种浅挂线法,即挂至内口与脓腔顶端连线的中上1/3或中1/2交界处,暂不紧线,术后7-14 d,脓腔缩小、分泌物减少时紧线,这样操作难度降低亦不影响疗效。此外,还有切开双挂线引流术<sup>[20,21]</sup>、隧道式切开引流挂线术<sup>[22]</sup>、旷置引流挂线术<sup>[23]</sup>等,都作了不同程度的改进,取得满意的临床效果。

3.2 挂虚线 挂虚线(虚挂法),又称浮挂法,是指将挂线松弛地挂在脓腔的内外口之间。国外亦称“seton drainage”。虚挂法与实挂法的区别就在于,挂线但不紧线,主要强调线的引流作用。虚挂法主要优点为<sup>[24]</sup>:(1)去除了实挂橡皮筋反复紧线的繁琐;(2)减轻反复紧线导致的巨大疼痛;(3)充分保护肛门部肌肉,减少术后并发症,保护肛门功能。国内钱海华<sup>[25]</sup>首先提出“虚挂线引流”这一概念。目前,国内大多数临床医师将保护肛门功能作为首要考虑的目标,倾向于采用虚挂疗法。经临床验证,实挂与虚挂2种方法的治愈率和复发率无明显差异,但就肛门功能完整性而言,虚挂线明显优于实挂线,即虚挂能更好地保护肛门括约肌功能。国外也主要强调挂线的引流与标志作用,而不轻易使用切割挂线法。Ritchie等<sup>[26]</sup>在查阅了大量文献后,综合分析得出用切割挂线法治疗肛瘘,大便失禁率平均在12%,其中稀便失禁率仅次于气体失禁率。Faucheron等<sup>[27]</sup>认为引流挂线法几乎不会引起大便失禁,其功能主要在于引流,而非切割肛门括约肌。Held等<sup>[28]</sup>指出挂线可以促进伤口引流和防止伤口假性愈合。国外采用引流挂线法大多用于继发于肛周克罗恩病或获得性免疫缺陷综合征的肛管直肠周围脓肿。如Makowiec等<sup>[29]</sup>通过

一项前瞻性的随访研究得出:采用挂线和导管引流治疗由克罗恩病引起的肛管直肠周围脓肿是安全而高效的。Pritchard等<sup>[30]</sup>用8年时间回顾了38例因克罗恩病引起的肛管直肠周围脓肿患者的治疗资料,认为采用长期导管引流能大大提高整体治疗效果。

国内伍静等<sup>[31]</sup>将保留括约肌虚挂线法(治疗组)和切开挂线引流法(对照组)进行对比研究,得出保留括约肌虚挂线法在术后疼痛、切口愈合时间和保护肛门功能等方面明显优于切开挂线引流法。临床上,根据肛管直肠周围脓肿的复杂程度不同,虚挂的方式也各不相同。金振美<sup>[32]</sup>将65例高位蹄铁型肛周脓肿患者分为3组进行对比研究,其中治疗组为浮挂引流药线组(30例),对照组分别为浮挂引流线组(20例)和不挂浮线组(15例),治疗组主要在丝线上掺入自制的具清热收湿、祛腐生肌的药物牛黄散(由牛黄、珍珠、麝香、黄连、乳香、没药、冰片、煅龙骨、煅牡蛎、石决明、轻粉、熊胆等药物组成)。浮挂引流线组采用挂线但不掺入牛黄散,而不挂浮线组则在主切口与侧切口之间不放引流线。结果浮挂引流药线组在术后创面疼痛程度、分泌物程度、创面愈合时间方面均优于其他2组。史仁杰<sup>[33]</sup>采用多切口虚挂引流术治疗均为涉及2个以上间隙,深部在外括约肌以上的多间隙高位脓肿32例。该术式治疗要点为:对于内口以上的脓腔,以单股或双股橡皮筋纵向松弛挂在脓腔顶端与内口间。其余脓腔,如脓腔较大,则在肛外每隔2-3 cm作一长约1.5-3.0 cm切口切开脓腔壁,每相邻2个切口间横向松弛穿挂双股橡皮筋以引流。结果一次性治愈31例,无肛门失禁等后遗症发生。史氏强调为了确保对高位脓肿采用虚挂线法获得成功,最好选择急性肛门直肠周围脓肿脓液稠厚、脓腔壁薄、内口部硬结适中、身体健壮者。李洪林等<sup>[34]</sup>采用切开挂浮线(标志线)预期根治术治疗87例均为肛管直肠环以上的脓肿患者,结果无1例形成肛瘘,无大便失禁等后遗症。作者指出该术式能明显减轻术后及换药时的疼痛,术后愈合瘢痕明显缩小,对肛门形态改变不大。此外,还有放射状多切口挂浮线引流法<sup>[35]</sup>、对口切旷加拖线疗法<sup>[36]</sup>、高位虚挂线加低位对口引流法<sup>[37]</sup>。

临床上,还有强调突出保留括约肌的挂线术式。如徐子鹏等<sup>[38]</sup>于1990年提出内挂线法,即改变传统的从肛门外挂线,而采用从直肠壁内挂线。这种挂线的优点在于对肛门外括约肌不作

### ■应用要点

根据肛管直肠周围脓肿复杂程度的不同,灵活选用挂线方式,如实挂,或虚挂,或实挂与虚挂相结合,并根据实际情况,配合其他疗法。

切开,而是在脓腔顶部对着肠壁薄弱处人工凿一个口,将脓液引入肠壁内进行引流.与外挂线相比,其明显的优点即保持了肛周形态的完整.赵世华<sup>[39]</sup>、张艳等<sup>[40]</sup>及王金凤<sup>[41]</sup>都有相关报道,皆取得一定的临床效果.

3.3 挂线合并其他疗法 吴菊平<sup>[42]</sup>报道用线管引流加切开挂线术治疗11例复杂的蹄铁型肛周脓肿,全部一次性治愈,随访2年,无一例复发.吴氏指出,蹄铁型肛周脓肿因呈弯形,一侧或两侧同发,针对弯形脓腔,采用保留皮桥,线管引流,保持了肛门基本形态.蒋守龙等<sup>[43]</sup>、葛琪等<sup>[44]</sup>都有相关报道.挂线用的材料一般为橡皮筋,但很难满足所有类型脓腔的引流条件.为了加强引流,临床上出现了各种形式的引流材料,诸如T管<sup>[45]</sup>、梅花头导尿管<sup>[46]</sup>、血浆管<sup>[47]</sup>、半胶管<sup>[48]</sup>(由无菌乳胶管剖开制成)、硅胶管<sup>[49]</sup>、黄升药条<sup>[50]</sup>等.赵怀鑫<sup>[51]</sup>采用一期切开挂线加术后微波治疗,结果术后患者疼痛轻,炎症水肿消退快,创口愈合好.因微波能改善肛周局部微循环,促进组织细胞生长,促进创面愈合<sup>[52]</sup>.

还有采用挂线配合中药坐浴<sup>[53-55]</sup>,挂线配合内服排脓生肌中药<sup>[56]</sup>,都取得了较好的疗效.

#### 4 挂线疗法治疗肛管直肠周围脓肿的关键要点

4.1 正确寻找内口和处理内口 直肠后间隙及骨盆直肠间隙脓肿一般脓液形成较多,脓腔较大,薄弱点很难确定,此时对应的内口穿出应在脓腔的最薄弱处.马蹄形脓肿其形成原因不同,内口的部位亦不同.骨盆直肠间隙脓肿通过直肠后间隙扩散对侧形成的马蹄形肛周脓肿,其内口的穿出一般与最先形成的脓肿的部位有关.同时还要注意有可能有多个内口的情况,不能遗漏.应注意的是高位脓肿的内口仍然在齿线处,高位内口并不存在,所以仍应选择最低位寻找内口<sup>[57]</sup>.

4.2 挂实线和挂虚线的应用指征 实挂与虚挂比较而言,实挂主要用于对内口进行处理,虚挂主要用于引流脓腔.具体运用时,还要根据病程、脓肿的范围、脓腔大小等方面而定.史仁杰<sup>[58]</sup>总结为:对所挂组织多者挂线宜紧,所挂组织少者挂线宜松;肛直环厚者挂线宜紧,肛直环薄者所挂组织宜松.脓腔深大者挂线宜松,脓腔狭小者挂线宜紧;脓腔炎性浸润较重者,橡皮筋宜松,可推迟紧线时间.

4.3 关于紧线的问题 王晓宏等<sup>[59]</sup>认为肛管直肠周围脓肿在急性炎症期,肛周组织脆弱,早期紧

线,宜造成组织过快切开,感染的创面不能随线修复,应等充分引流,组织炎症消退后再行紧线.潘良富<sup>[60]</sup>主张除黏膜下和高位肌间脓肿在术中作一次紧线外,对高位挂线不作一次紧扎.丁义江<sup>[61]</sup>认为肛管直肠周围脓肿术后紧线不宜参照肛瘘中紧线的长度.肛瘘多在局部组织处于非炎症期手术,瘻道挂线处有较多的纤维化组织,而肛管直肠周围脓肿处在急性炎症期,组织水肿脆弱,因此初期只能轻度紧线,以后每次紧线的长度宜在0.2-0.4 cm(橡皮筋的自然长度),后期可稍延长.对肛周较大创面,宜先引流挂线,待创面肉芽生长填充较多后再作紧线,以减少肛管损伤.

#### 5 结论

目前挂线疗法已成为治疗肛管直肠周围脓肿的一种成熟疗法.临床医师根据脓肿复杂程度的不同,已能灵活运用挂实线、挂虚线,实挂、虚挂相结合,以及挂线配合其他疗法,进行不同程度的创新,将后遗肛瘘的发生率大大减少,提高了根治率,保护了肛门功能,取得了较大进展.但必须指出的是:挂线疗法的相关要点,尚需进一步规范,以更科学地挂线,便于广大临床医师掌握,更好地发挥挂线疗法的作用.

#### 6 参考文献

- 1 吴阶平,裘法祖.黄家驷外科学.第6版.北京:人民卫生出版社,1996:1169
- 2 杨向东,安辉,曹哲剑,汪丽娜,彭国琴,张琦,顾尽辉.曹吉勋教授一期手术根治肛管直肠周围脓肿的经验.中华中医药学会第十二次大肠肛门病学术会议 2006:171-173
- 3 胡伯虎,史兆歧,周济民.犬肛门括约肌切开与挂线对直肠肛门管静止压的影响及组织病理学观察.中医杂志 1983; 24: 48
- 4 张琳,朱镇宇.定向挂线在高位肛瘘治疗中的临床效果.中华现代外科学杂志 2006; 3: 1801-1803
- 5 曾莉.挂线疗法的治疗机理.江苏中医药 2006; 27: 4-5
- 6 徐廷翰.挂线多切口引流法治疗肛周脓肿41例.四川中医 1987; 8: 38-39
- 7 李春雨,聂敏,田振国,杨明,崔丽.一次性切开挂线法治疗高位肛管直肠周围脓肿110例报告.辽宁医学杂志 2001; 15: 76-77
- 8 史仁杰.肛瘘挂线疗法的焦点问题.中国肛肠病教育研讨会暨第十二届中日大肠肛门病学术交流 2008: 377-380
- 9 郑芳.一次性切开挂线放射状多切口引流治疗高位马蹄形肛管直肠周围脓肿128例.结直肠肛门外科 2012; 18: 122-123
- 10 王鑫,曹艳玲,吕亚西.切开加挂线一次性治愈高位直肠周围脓肿316例.时珍国医国药 2007; 18: 946
- 11 吕飞跃,宁国礼,高占军,王利群.一期切开引流加挂线术治疗肛管直肠周围脓肿308例.第四军医大学吉林军医学院学报 2002; 24: 33-34
- 12 陈邑岐,钱剑秋.一次性切开挂线对口引流治疗高位肛周脓肿体会.现代中西医结合杂志 2006; 15:

#### ■名词解释

挂线疗法:在肛管直肠周围脓肿外作一切口,通过套在探针上的丝线将橡皮筋从外口引入,并从内口穿出,然后将橡皮筋两端适当拉紧,并用丝线结扎,剪去多余的橡皮筋.

### ■同行评价

本文介绍挂线技术在肛周脓肿治疗中的应用,对临床有一定的指导意义。

- 207-208
- 13 吴至久,唐学贵. 一次切开挂线对口引流治疗高位肛周脓肿43例临床分析. 结直肠肛门外科 2007; 13: 315
- 14 郑金坚,谭红. 切开对口引流挂线术治疗高位肛周脓肿. 广西中医学院学报 2007; 10: 39-40
- 15 钱海华. 朱秉宜教授运用挂线疗法治疗高位肛瘘经验. 南京中医药大学学报 2009; 25: 387-391
- 16 黄乃健. 中国肛肠病学. 第1版. 济南: 山东科学技术出版社. 1996: 756
- 17 吴泽炎. 切开引流清创挂线术治疗高位肛周脓肿30例报告. 福建医药杂志 2002; 24: 117
- 18 蒋进广,王猛,陈娟,陈玉根. 改良 I 期切开挂线引流术治疗高位肛周脓肿24例疗效观察. 结直肠肛门外科 2012; 18: 194-195
- 19 陈玉根,孙桂东,李国年,史仁杰,黄继成,谷云飞,朱秉宜. 浅挂线法治疗高位肛周脓肿的临床研究. 辽宁中医杂志 2007; 34: 591-592
- 20 何德才,向锋,赵自星. 切开双挂线引流术治疗高位后蹄铁型肛周脓肿多中心对照研究. 四川中医 2007; 25: 76-78
- 21 许方方. 切开双挂线对口引流术治疗蹄铁型肛周脓肿36例临床分析. 安徽医学 2008; 29: 128-129
- 22 黄国学,王茂林. 隧道式切开引流挂线治疗环状肛周脓肿25例. 福建医药杂志 2011; 33: 103-104
- 23 王廷杰,李振宇,李莉,张云鹏. 一期旷置引流挂线术治疗复杂性肛周脓肿临床观察. 中国现代医生 2008; 46: 131-132
- 24 钱海华,于丽杰. 高位虚挂引流法在高位肛瘘手术中的应用体会. 吉林中医药 2004; 24: 35-36
- 25 钱海华. 论实挂与虚挂. 江苏中医药 2006; 27: 8
- 26 Ritchie RD, Sackier JM, Hodde JP. Incontinence rates after cutting seton treatment for anal fistula. *Colorectal Dis* 2009; 11: 564-571 [PMID: 19175623]
- 27 Faucheron JL, Saint-Marc O, Guibert L, Parc R. Long-term seton drainage for high anal fistulas in Crohn's disease--a sphincter-saving operation? *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 208-211 [PMID: 8620789]
- 28 Held D, Khubchandani I, Sheets J, Stasik J, Rosen L, Riether R. Management of anorectal horseshoe abscess and fistula. *Dis Colon Rectum* 1986; 29: 793-797 [PMID: 3792160]
- 29 Makowiec F, Jehle EC, Becker HD, Starlinger M. Perianal abscess in Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 443-450 [PMID: 9106694]
- 30 Pritchard TJ, Schoetz DJ, Roberts PL, Murray JJ, Collier JA, Veidenheimer MC. Perirectal abscess in Crohn's disease. Drainage and outcome. *Dis Colon Rectum* 1990; 33: 933-937 [PMID: 2226080]
- 31 伍静,刘洪,杨春梅,何洪波. 保留括约肌虚挂线法治疗高位肛周脓肿. 华西医学 2012; 27: 723-726
- 32 金振美. 浮挂引流药线对高位蹄铁型肛周脓肿的作用. 中国中西医结合外科杂志 2008; 14: 473-474
- 33 史仁杰. 多切口虚挂引流术治疗多间隙高位肛周脓肿32例. 河北中医 2008; 30: 136-137
- 34 李洪林,岳伯华,戴运刚. 切开挂浮线与其根治术治疗高位肛周脓肿87例疗效观察. 中国实用医药 2007; 2: 68-69
- 35 刘金城. 放射状多切口挂浮线引流术一次性根治蹄铁形肛周脓肿的临床研究. 长春中医药大学学报 2010; 26: 235-236
- 36 应光耀,林晖,孙健,熊国华,何春梅. 对口切扩加拖线治疗高位后蹄铁型肛周脓肿临床疗效观察. 世界中西医结合杂志 2012; 7: 487-489
- 37 张波,陈浩. 高位虚挂线加低位对口引流法治疗深部肛周脓肿24例. 江苏医药 2011; 37: 852-853
- 38 徐子鹏,王跃,王艳. 直肠内壁挂线术的治疗机理. 中国肛肠病杂志 1990; 10: 12-13
- 39 赵世华. 直肠内壁挂线术治疗高位肛管直肠周围脓肿27例. 湖南中医药导报 2003; 9: 32-33
- 40 张艳,李海峰. 肛门直肠内壁挂线治疗肛周脓肿50例. 中国社区医师 2004; 6: 25
- 41 王金凤. 直肠内壁挂线术治疗直肠周围脓肿. 新医学导刊 2008; 7: 65
- 42 吴菊平. 线管引流加切开挂线术治疗蹄铁型肛周脓肿. 医药世界 2006; 11: 80
- 43 蒋守龙,曹俊,徐介预. 挂线加腔内置管引流治疗高位肛周脓肿疗效观察. 现代中西医结合杂志 2008; 17: 1858-1859
- 44 葛琪,韦平. 一次性切开挂线置管引流法治疗高位肛周脓肿体会. 中国医药指南 2008; 6: 341-342
- 45 陈朝晖,陈宏斌,吴印书,严国锋,郑发娟,饶鹏. T管引流加内口扩创挂线术治疗高位多间隙肛周脓肿30例. 中国中西医结合外科杂志 2009; 15: 33-35
- 46 于海鹰,丛中利,罗玲,杨松旭. 切开挂线配合留置梅花头尿管引流术治疗高位肛周脓肿50例临床观察. 中国肛肠病杂志 2009; 29: 25-27
- 47 江少臣,喻敬东. 脓肿切开引流挂线术及脓肿切开血浆管引流术治疗肛周脓肿88例体会. 临床外科杂志 2007; 15: 501
- 48 王传思,谢贻祥. 半胶管引流 I 期根治多间隙肛周脓肿的临床研究. 结直肠肛门外科 2011; 17: 328-330
- 49 高宝良,陈子胜,周秀扣,陈宝华. 内口切开挂线引流治疗直肠后间隙脓肿10例. 中国中西医结合外科杂志 2002; 8: 118
- 50 李秀萍. 中西医结合切开挂线与单纯切开挂线治疗肛周脓肿60例的对照观察. 浙江创伤外科 2011; 16: 183-184
- 51 赵怀鑫. 一期切开挂线加微波治疗高位肛周脓肿68例疗效分析. 中国全科医学 2010; 13: 2394-2395
- 52 刘忠华. 微波照射对肛周脓肿术后创面愈合的疗效观察. 华夏医学 2008; 21: 797-798
- 53 张玉镇. 切开挂线术加中药坐浴治疗肛周脓肿65例. 河南中医 2004; 24: 48
- 54 陈洪林,施耀辉,封以生,唐英,盛薇,项亚军. 虚挂线保留肛门括约肌配合中药坐浴治疗高位肛周脓肿17例. 河北中医 2009; 31: 1788
- 55 范丽颖. 一次性切开挂线术并中药熏洗治疗肛周脓肿68例. 实用中医内科杂志 2011; 25: 63-64
- 56 谢川箭. 切开引流(挂线)术配合排脓生肌中药根治高位肛周脓肿疗效研究. 中国社区医师(医学专业) 2012; 14: 178-179
- 57 郭景武,金振美,郭莉莉,刘翠红. 保留皮桥一次根治术治疗多间隙肛周脓肿266例. 中国中西医结合外科杂志 2006; 12: 589
- 58 史仁杰. 肛管直肠周围脓肿切开挂线术中的若干细节问题. 首届国际中西医结合大肠肛门病学学术论坛暨第十二届全国中西医结合大肠肛门病学学术会议 2007: 363-367
- 59 王晓宏,李柏年. 高位肛瘘挂线疗法的若干问题. 中国(南京)肛肠外科国际论坛 2006: 155-156
- 60 潘良富,谷云飞. 一次性根治肛周高位脓肿218例. 中国肛肠病杂志 2000; 20: 10-11
- 61 丁义江. 丁氏肛肠病学. 北京: 人民卫生出版社. 2006: 268

编辑 田滢 电编 鲁亚静



# 龙血素对肝星状细胞的影响

李玉莲, 宋正己, 范红, 彭伟, 高建梅, 沈涛

李玉莲, 宋正己, 范红, 彭伟, 云南省第一人民医院 昆明理工大学附属昆华医院消化内科 云南省昆明市 650032  
高建梅, 沈涛, 云南省第一人民医院 昆明理工大学附属昆华医院基础医学研究所 云南省昆明市 650032  
李玉莲, 主要从事消化内科的相关研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30960454/C180108  
云南省科技计划应用基础研究计划基金资助项目, No. 2008ZC084M  
作者贡献分布: 课题由范红, 宋正己, 彭伟及李玉莲共同设计, 研究过程由宋正己与李玉莲操作完成实验测试及分析工具由高建梅与沈涛提供, 数据分析有范红, 宋正己及李玉莲共同完成。  
通讯作者: 范红, 教授, 650032, 云南省昆明市金碧路157号, 云南省第一人民医院消化科, ynfanhong@163.com  
收稿日期: 2012-11-14 修回日期: 2012-12-28  
接受日期: 2012-12-28 在线出版日期: 2013-01-08

## Influence of treatment with loureirin on rat hepatic stellate cells *in vitro*

Yu-Lian Li, Zheng-Ji Song, Hong Fang, Wei Peng, Jian-Mei Gao, Tao Shen

Yu-Lian Li, Zheng-Ji Song, Hong Fang, Wei Peng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Technological University, Kunming 650032, Yunnan Province, China  
Jian-Mei Gao, Tao Shen, Institute of Basic Medicine, the Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Technological University, Kunming 650032, Yunnan Province, China  
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30960454/C180108; and the Science and Technology Application Project of Yunnan Province, No. 2008ZC084M  
Correspondence to: Hong Fang, Professor, Department of Gastroenterology, the Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Technological University, Kunming 650032, Yunnan Province, China. ynfanhong@163.com  
Received: 2012-11-14 Revised: 2012-12-28  
Accepted: 2012-12-28 Published online: 2013-01-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the effects of treatment with loureirin A/B on rat hepatic stellate cells (HSCs) *in vitro*.

**METHODS:** HSC-T6 cells were cultured in 96-well plates for 24 h and then incubated with different concentrations of loureirin A/B for 48 h. MTT assay was used to assess the proliferation of HSCs. The contents of hyaluronic acid, laminin and collagen type IV in culture supernatants were measured by radioimmunoassay. The

mRNA expression of blood vessel endothelium (VEGF<sub>165</sub>) and histoplasma tissue inhibitory factor (HIF-1) was detected by real-time fluorescence quantitative PCR.

**RESULTS:** The half maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of loureirin A/B were 0.3 and 0.1 μg/μL, respectively. Treatment with loureirin A/B significantly inhibited HSC proliferation, the secretion of hyaluronic acid, laminin and collagen type IV (31.1 ± 4.32 vs 43.05 ± 4.96, 441.28 ± 25.38 vs 302.98 ± 29.59, 17.96 ± 3.00 vs 25.23 ± 4.96, all *P* < 0.05), and the mRNA expression of VEGF<sub>165</sub> and HIF-1. The effects of loureirin B were stronger than those of loureirin A.

**CONCLUSION:** Treatment with loureirin A/B could significantly inhibit the proliferation of HSCs, the secretion of hyaluronic acid, laminin and collagen type IV, and the mRNA expression of VEGF<sub>165</sub> and HIF-1, and the effects of loureirin B were stronger than those of loureirin A.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Hepatic stellate cells; Extracellular matrix; Loureirin; VEGF<sub>165</sub>; HIF-1

Li YL, Song ZJ, Fang H, Peng W, Gao JM, Shen T. Influence of treatment with loureirin on rat hepatic stellate cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 87-92

### 摘要

**目的:** 观察龙血素A/B对肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)增殖及各种物质表达的影响。

**方法:** 将HSC分为3组: 空白对照组、细胞对照组、药物干预组。用MTT法观察龙血素A/B对HSC-T6增殖的影响, 并检测细胞上清中透明质酸酶(hyaluronidase, HA)、层粘连蛋白(hyaluronidase, LN)、IV型胶原(collagen type IV, IV-C)的含量。采用Real time-PCR检测HSC经龙血素A/B处理前后血管内皮生长因子(blood vessel endothelium, VEGF<sub>165</sub>)和低氧诱导因子(histoplasma tissue inhibitory factor,

### ■背景资料

龙血素B是龙血竭黄酮的主要成分, 主要分布于血流量大的脏器, 如肝脏、肾脏等。多种黄酮类化合物被证实具有明显的防治肝纤维化的作用。龙血竭能有效地减轻肺纤维化大鼠肺组织的纤维化程度, 龙血素B还能对硫代乙酰胺诱导的大鼠肝纤维化有一定的预防和治疗作用。

### ■同行评议者

管冬元, 副教授, 上海中医药大学基础医学院实验医学教研室

## ■ 研发前沿

近年研究发现,肝星状细胞(HSC)活化同时伴有的内皮细胞活化和新生血管形成是进展性肝纤维化间质重建中最突出的病理特征,在肝纤维化病理生理中起重要作用。也有研究表明龙血竭对硫代乙酰胺诱导的肝纤维化有一定的预防和治疗作用。

HIF-1)mRNA表达的影响。

**结果:** HSC的抑制率均随龙血素A/B的浓度增高而增高,且龙血素A的 $IC_{50}$ 约为 $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,龙血素B的 $IC_{50}$ 约为 $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ;与正常对照组相比,药物干预组的HA、LN、IV-C含量降低( $31.10 \pm 4.32$  vs  $43.05 \pm 4.96$ ,  $441.28 \pm 25.38$  vs  $302.98 \pm 29.59$ ,  $17.96 \pm 3.00$  vs  $25.23 \pm 4.96$ , 均  $P < 0.05$ ); VEGF和HIF-1  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值明显降低,且龙血素B组较龙血素A明显。

**结论:** 龙血素A/B均可抑制HSC的增值,龙血素A抑制较龙血素B明显;其还可下调HSC中HA、LN、IV-C及VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA的表达,龙血素B较龙血素A下调效果明显。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 肝星状细胞; 龙血素; 血管内皮生长因子; 低氧诱导因子

李玉莲, 宋正己, 范红, 彭伟, 高建梅, 沈涛. 龙血素对肝星状细胞的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(1): 87-92  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/87.asp>

## 0 引言

肝纤维化是肝组织慢性损伤后反复的愈合修复和间质重塑过程,肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化和表型改变是肝纤维化的中心事件,活化HSC增殖、细胞迁移、收缩性增加,并产生过量的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)聚集于Disss间隙,引起窦毛细血管内皮窗孔关闭,血窦内压力增加,肝细胞营养障碍<sup>[1]</sup>。近年研究发现, HSC活化同时伴有的内皮细胞(endothelial cell, EC)活化和新生血管形成是进展性肝纤维化间质重建中最突出的病理特征,在肝纤维化病理生理中起重要作用<sup>[2-4]</sup>。前期试验也表明龙血竭对硫代乙酰胺诱导的肝纤维化有一定的预防和治疗作用。本实验在此基础上,通过研究传统中药龙血竭主要成分龙血素A/B对HSC生长、分泌,及其中血管内皮生长因子(blood vessel endothelium, VEGF<sub>165</sub>)和低氧诱导因子(histoplasma tissue inhibitory factor, HIF-1) mRNA表达的影响,初步探讨龙血竭改善纤维化的机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** HSC-T6 细胞系购自中国科学院昆明细胞库。龙血素A/B中药化学对照品,中国药品生

物制品检定所(用甲醇配成 $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的原液,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  储存); DMEM高糖培养液、PBS缓冲液,均购自北京海克隆;新西兰新生牛血清购自美国Gibco公司;青霉素-链霉素溶液、0.25%胰蛋白酶溶液均购自Bioind公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自sigma公司(用前配成0.5%贮存液微孔滤膜( $0.22 \mu\text{m}$ )过滤后,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  储存备用); SW-CJ-2F标准型净化工作台(吴江市绿岛净化设备厂); 倒置显微镜(Olympus, BX60); 美国Thermo Scientific Forma series II水套 $\text{CO}_2$ 培养箱; 细胞基因组总RAN提取试剂盒(离心柱型)、Fermentas K1622逆转录试剂盒、 $2 \times \text{Taq PCR Mastermix}$ ; SYBR Green II (宝生物)、琼脂糖、DNA分子标准Marker, TBE缓冲液。

## 1.2 方法

**1.2.1 MTT法测定龙血素对HSC增殖的影响:** (1) 细胞的复苏: 细胞自液氮中取出, 立即放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水中快速溶化, 离心 $1000 \text{ r}/\text{min}$ ,  $5 \text{ min}$ , 移去上清液后, 加入含10%小牛血清的DMEM高糖培养液, 移入 $25 \text{ cm}^2$ 培养瓶, 放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mL}/\text{L}$   $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。记录复苏日期, 次日换液。当细胞铺满整个培养瓶80%-90%后, 0.25%胰蛋白酶消化约 $30 \text{ s}$ , 传代培养; (2) MTT比色法检测HSC的增殖: 复苏后至少传代培养一代, 将处于对数生长期的HSC用含10%小牛血清的DMEM高糖培养液配成 $1 \times 10^5$ 细胞悬液, 接种于96孔板, 每孔 $100 \mu\text{L}$ 。将培养的HSC分为3组: 空白对照组、细胞对照组、甲醇组(排除甲醇对细胞的影响); 药物干预组。各组干预情况见表1。置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、饱和湿度、 $50 \text{ mL}/\text{L}$   $\text{CO}_2$ 培养箱内培养,  $24 \text{ h}$ 后将不同浓度的药物(设 $0.5$ 、 $0.4$ 、 $0.2$ 、 $0.1$ 、 $0.05$ 、 $0.025 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 6个药物终浓度)加入药物干预组培养孔, 各浓度均设5个复孔。 $48 \text{ h}$ 后每孔加0.5%MTT贮存液 $20 \mu\text{L}$ , 继续孵育 $4 \text{ h}$ 后弃上清, 每孔加入二甲基亚砷(DMSO) $150 \mu\text{L}$ 溶解细胞内结晶, 微型振荡器震荡 $10 \text{ min}$ 后, 用全自动酶标仪在 $490 \text{ nm}$ 波长处比色法测定各孔A值, 测得的各复孔A值取平均数。抑制率(IE) = (对照孔 $A_{490}$ -实验孔 $A_{490}$ /对照孔 $A_{490}$ )  $\times 100\%$ 。观察药物对细胞生长的影响。

**1.2.2 Real-time PCR:** (1) 总RNA提取: 将处于对数生长期的HSC-T6用配成 $2 \times 10^5$ 细胞悬液, 接种于6孔板, 每孔 $2 \text{ mL}$ 。将培养的HSC分为2组: 正常对照组、药物干预组。 $24 \text{ h}$ 后正常对照组加入培养液, 药物干预组加入含龙血素A/B的培养液各 $200 \mu\text{L}$ , 药物终浓度龙血素A为 $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

表 1 各组细胞干预情况

分组	干预情况
空白对照组	100 μL培养基, 24 h后加入培养基100 μL
细胞组	100 μL 1 × 10 <sup>5</sup> 个/mL细胞悬液细胞, 24 h后加入培养基100 μL
甲醛组	100 μL 1 × 10 <sup>5</sup> 个/mL细胞悬液细胞, 24 h后加入加含不同浓度(1/25; 1/100; 1/500)甲醛培养基100 μL
药物干预组(龙血素A)	100 μL 1 × 10 <sup>5</sup> 个/mL细胞悬液细胞, 24 h后加含不同浓度龙血素A(设0.5、0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 μg/μL, 6个药物终浓度)的培养基100 μL
药物干预组(龙血素B)	100 μL 1 × 10 <sup>5</sup> 个/mL细胞悬液细胞, 24 h后加含不同浓度龙血素B的培养基100 μL

表 2 PCR扩增引物系列

目的基因	引物序列	退火温度(°C)	产物长度(bp)
内参基(GAPDH)	F: 5'-CTCCATTCTCCACCTTG-3'	59	110
	R: 3'-ATGAGGTCCACCACCTGTT-5'		
VEGF <sub>165</sub>	F: 5'-CCGCAGACGTGTAATGTTCC-3'	62	207
	R: 3'-GACGGTGACGATGGTGGTGT-5'		
HIF-1	F: 5'-CAGTTACAGGATTCCAGCAGAC-3'	63	152
	R: 3'-TACTTGGGTAGAAGGTGGAGAT-5'		

■创新盘点

本实验通过MTT法检测龙血素A/B对肝星状细胞生长的抑制作用, 表明: 龙血素A/B均可抑制HSC增值及活化, 且龙血素主要成分龙血素B的抑制作用较龙血素A明显, 龙血素B对HSC的抑制可能成为临床抗肝纤维化的新途径。

龙血素B为0.1 μg/μL. 各浓度均设5个复孔. 细胞培养48 h后, 取上清每孔800, 放免发检测细胞上清中HA、LN、IV-C的含量. 剩余上清弃去, PBS洗两遍后, 按细胞基因组RNA提取试剂盒说明提取总RNA, 微量核酸蛋白分析仪测定总RNA浓度和纯度, -80 °C保存备用; (2)单链DNA(cDNA)合成: 取1 μg总RNA进行逆转录, 反应体系20 μL: 其中总RNA 3 oligo(dt)18 primer 1、DEPC-treat water 8、5×Reaction Buffer 4、Ribolock RNase inhibitor 1、10Mm dNTP Mix 2、RevertAid M-MuLν Reverse transcriptase 1 μL. 反应条件: 42 °C 60 min, 72 °C 5 min; (3)引物特异性检测: 取cDNA进行常规PCR反应. 引物用BLAST软件进行在线核实其特异性后由中美泰和生物技术服务有限公司合成(表2). 反应体系20 μL: 2×Taq PCR Master mix 5 μL, 上、下游引物各1 μL, 模板DNA 2.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 1 μL. 阴性对照管中模板cDNA用ddH<sub>2</sub>O 2 μL代替. 反应条件: 94 °C预变性3 min, 94 °C变性30 s, 内参基(GAPDH)59 °C、VEGF<sub>165</sub> 62 °C、HIF-1 63 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 循环40次, 72 °C后延伸3 min, -4 °C保存. 取PCR反应产物5 μL与溴酚蓝2 μL混匀上样, 在1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 电泳在1×TBE缓冲液中进行, 电压100 V, 时间45 min, 电泳结束后用凝胶成像分析系统摄像; (4)Real-time PCR: 将逆转录的到的cDNA原液按1、1×10<sup>-1</sup>、1×10<sup>-2</sup>、1×10<sup>-3</sup>梯度稀释后, 各取2 μL稀

释好的cDNA进行RT-PCR反应, 检测发现目的基因的扩增效率和管家基因的扩增效率一致, 可应用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法进行相对定量. 采用SYBR®Premix Ex Taq™ II试剂盒, 在罗氏LightCycler®480荧光定量系统上进行检测, 反应条件如下: 荧光染料5 μL, 上、下游引物各0.75 μL, 模板DNA取2.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 1.5 μL, 反应体积为10 μL. 反应条件: 95 °C预变性3 min, 95 °C变性10 s, 均为63 °C退火20 s, 72 °C延伸30 s, 循环40次, 72 °C后延伸3 min. 反应完毕后根据溶解曲线分析PCR产物的特异性, 并由Light Cycler PCR仪分析定量结果, 以达到阈值的最低循环数(Ct值)计算样本中mRNA拷贝数相对量. 每个样本的Ct值由目的基因和管家基因决定, 即ΔCt(目的基因) = Ct(目的基因)-Ct(管家基因), ΔΔCt(目的基因) = ΔCt(目的基因)-ΔCt(标准值). 样品中目的基因的相对拷贝量为2<sup>-ΔΔCt</sup>. 记录各组Ct值, 通过2<sup>-ΔΔCt</sup>, 计算各组细胞VEGF<sub>165</sub>和HIF-1的mRNA表达水平.

**统计学处理** 数据用mean ± SD表示, 采用SPSS17.0统计分析软件的配对t 检验比较, P<0.05表示差别有统计学意义.

2 结果

2.1 龙血素A/B对HSC-T6增值的影响 IC<sub>50</sub>在凋亡方面, 是指一定浓度的某种药物诱导细胞凋亡50%, 该浓度称为50%抑制浓度, 即凋亡细胞与全部细胞数之比等于50%时所对应的浓度, 可



### ■应用要点

龙血素A/B均可抑制HSC的增值并降低其细胞上清中纤维化标志物的含量,还可下调HSC中VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA的表达,且龙血素B的效果较龙血素A明显.以上作用可能与龙血竭胶囊抑制肝纤维化过程中微血管的新生并延缓肝纤维化有关.

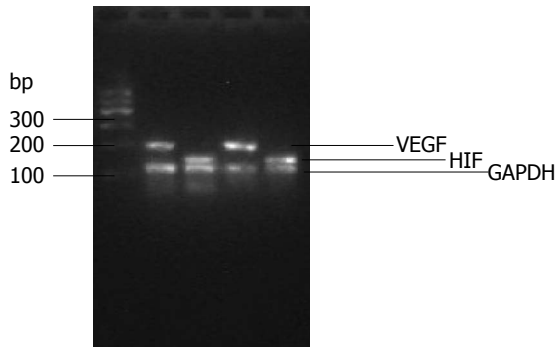


图1 引物特异性检测结果.

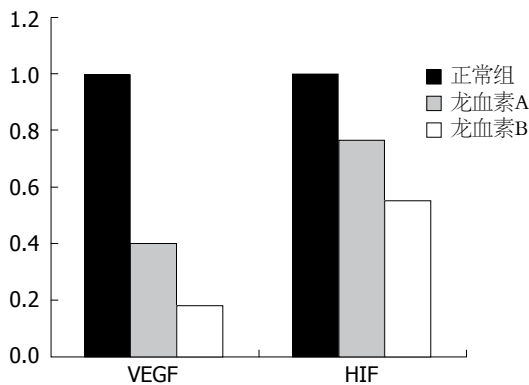


图2 龙血素A/B对肝星状细胞中VEGF及HIF的影响. VEGF: 血管内皮生长因子; HIF: 低氧诱导因子.

以用来衡量药物诱导凋亡的能力,即诱导能力越强,该数值越低,也可以反向说明某种细胞对药物的耐受程度.实验表明龙血素A/B均可抑制HSC的增值,排外甲醇对细胞的影响,抑制率均随药物浓度增高而增高,IC<sub>50</sub>龙血素A为0.3 μg/μL.龙血素B为0.1 μg/μL,龙血素B抑制效果较龙血素A明显(表3).

2.2 龙血素A/B对HSC-T6细胞上清中HA、LN、IV-C含量的影响 龙血素A/B处理细胞后可不同程度抑制HSC分泌透明质酸、层粘连蛋白和IV胶原,且龙血素B的抑制效果优于龙血素A(表4).

2.3 龙血素A/B对HSC VEGF和HIF-1 mRNA表达的影响 用1.5%琼脂糖凝胶电泳分析各组常规PCR产物,以Marker为标准.可见常规PCR产物均显示特异性条带,与预期的DNA片段长度相吻合(图1).药物干预后,通过2<sup>-ΔΔCt</sup>,计算各组HSC VEGF及HIF mRNA表达水平.与正常对照组相比,龙血素A/B均能降低VEGF和HIF-1的2<sup>-ΔΔCt</sup>值,龙血素B的抑制效果较龙血素A明显,具有统计学意义(P<0.001,图2).

### 3 讨论

“龙血竭”具有活血、化瘀、止血、补血的功

表3 甲醇对细胞增殖的影响 (n = 5, mean ± SD)

甲醇比例	A值	抑制率(%)
0	0.572 ± 0.027	0.0
1/25	0.565 ± 0.025 <sup>a</sup>	1.2
1/100	0.569 ± 0.022 <sup>a</sup>	0.5
1/500	0.567 ± 0.061 <sup>a</sup>	0.8

<sup>a</sup>P<0.05 vs 0(正常对照组).

效,被誉为“活血圣药”<sup>[5]</sup>.其主要化学成分和生理活性成分是酚类化合物<sup>[6]</sup>,主要为总黄酮,龙血素A、龙血素B是龙血竭黄酮的主要成分,主要分布于血流量大的脏器,如肝脏、肾脏等<sup>[7]</sup>.多种黄酮类化合物被证实具有明显的防治肝纤维化的作用<sup>[8]</sup>.龙血竭能有效地减轻肺纤维化大鼠肺组织的纤维化程度<sup>[9]</sup>,龙血素B还能对硫代乙酰胺诱导的大鼠肝纤维化有一定的预防和治疗作用<sup>[10]</sup>.龙血素A对局灶性脑缺血再灌注引起的损伤具有一定的保护作用<sup>[11]</sup>.但其具体机制尚不明确.

HSC是肝组织内的窦周细胞,其激活是肝纤维化发生、发展的中心环节和共同通路,他的活化表型或肌成纤维样细胞表型在调控间质血管生成方面起着积极作用<sup>[12]</sup>,而间质血管的改建与肝纤维化进展关系密切.活化的HSC在慢性肝损伤时分泌VEGF、转化生长因子β、血小板衍生生长因子等多种细胞因子,他们能同时促进星状细胞活化和血管生成.抑制HSC的活化或促进其凋亡,及减少其分泌的促微血管新生的细胞因子,能改善肝纤维化的发展.本实验通过MTT法检测龙血素A/B对肝星状细胞生长的抑制作用,表明:龙血素A/B均可抑制HSC增值及活化,且龙血竭主要成分龙血素B的抑制作用较龙血素A明显,龙血素B对HSC的抑制可能成为临床抗肝纤维化的新途径.

HA由间质细胞合成HSC是肝脏间质细胞的一种,约占肝脏间质细胞的1/3),是反映肝损害严重程度、判断有无活动性肝纤维化的定量指标,可较准确地反映肝内已生成的纤维量及肝细胞受损状况.IV-C为构成基底膜主要成份,可反映基底膜胶原更新率,含量增高可较灵敏反映出肝纤过程,是肝纤的早期标志之一.LN为基底膜中特有的非胶原性结构蛋白,可以反映肝纤维化的进展与严重程度.血清HA、IV-C、LN联合检测可对肝纤维化程度的判定、肝硬化的早期诊断具有一定的临床意义,是判断肝纤维

表 4 龙血素对肝星状细胞分泌透明质酸、层黏连蛋白和IV型胶原的影响 ( $\mu\text{g/L}$ )

剂量( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	分泌透明质酸		层黏连蛋白		IV型胶原	
	龙血素A	龙血素B	龙血素A	龙血素B	龙血素A	龙血素B
0	43.05 $\pm$ 4.96	43.05 $\pm$ 4.96	441.28 $\pm$ 25.38	441.28 $\pm$ 25.38	25.23 $\pm$ 4.96	25.23 $\pm$ 4.96
IC <sub>50</sub>	31.10 $\pm$ 4.32 <sup>a</sup>	28.50 $\pm$ 6.01 <sup>a</sup>	302.98 $\pm$ 29.59 <sup>a</sup>	243.53 $\pm$ 22.30 <sup>a</sup>	17.96 $\pm$ 3.00 <sup>a</sup>	13.28 $\pm$ 5.72 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 0(正常对照组).

化的敏感可靠指标<sup>[13]</sup>. 本实验结果显示: 血竭素A/B均可抑制HSC的增值, 还可不同程度的降低HSC细胞上清中HA、LN、IV-C的含量, 在IC<sub>50</sub>水平抑制效果最明显, 龙血素B的抑制效果优于龙血素A.

肝脏纤维化后, 血管神经纤维条索压迫后扭曲, 血运不畅, 出现缺氧情况, 引起肝组织血管新生<sup>[14]</sup>. 缺氧反应基因的调控主要是由HIF-1来实现. 有研究表明HIF-1-VEGF信号通路基因和蛋白表达上调是血管新生的部分机制<sup>[15]</sup>, 在纤维化形成过程中, 肝血窦的Disse间隙内过多ECM沉积, 使肝脏组织缺氧, 诱导HIF-1产生, 进而VEGF表达增加, 诱导新生血管的形成<sup>[16]</sup>, 机制可能为HIF-1启动VEGF的转录, 其次是缺氧时VEGF mRNA的稳定性增加, 最后HIF-1还可以上调VEGF受体Flt-1的转录, 该受体可增强VEGF的生物学效应. 其中HIF-1诱导VEGF转录活性的增强和表达增加在肿瘤血管生成中起重要作用.

在缺氧情况下, 组织细胞可出现变性坏死, 同时自由基产生增加, 从而诱发炎症反应, 这些炎症介质能刺激静止的HSC活化, 活化的HSC以及内皮细胞合成并分泌VEGF, 从而促进血管的生成, 分泌的VEGF又能促进活化的HSC增殖. 肝硬化炎症介质的释放, 细胞因子的作用及缺氧共同促成了微血管的新生. 由于肝纤维化区域的新生血管本身未成熟, 无法改善局部的组织缺氧, 呈现血管新生增加, 肝纤维化未消退反而增加的现象. 病理性血管新生可作为慢性肝脏疾病的潜在治疗靶标. HIF-1是相对较新的促血管生长因子的上游调控因子, 纠正肝脏缺氧状态或降低HIF的表达可以使HSC活化减少, 纤维化延缓; 抑制HSC的活化或促进活化HSC凋亡, 下调VEGF<sub>165</sub>和HIF-1在HSC中的表达可能成为抗血管新生和抗肝纤维化的有效途径. 本实验采用RT-PCR检测HSC药物处理前后VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA表达的影响, 结果显示药物处理

后HSC细胞中VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA的表达明显下调, 且龙血素B较龙血素A下调效果明显, 说明龙血素A/B可能通过抑制HSC的活化或促进活化HSC凋亡, 下调VEGF<sub>165</sub>和HIF-1在HSC中的表达来抑制血管新生和抗肝纤维化.

综上所述, 本研究初步观察了龙血素A/B对HSC生长、VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA表达及HSC上清中纤维化标志物的影响. 结果发现: 龙血素A/B均可抑制HSC的增值并降低其细胞上清中纤维化标志物的含量, 还可下调HSC中VEGF<sub>165</sub>和HIF-1 mRNA的表达, 且龙血素B的效果较龙血素A明显. 以上作用可能与龙血竭胶囊抑制肝纤维化过程中微血管的新生并延缓肝纤维化有关.

#### 4 参考文献

- Bataller R, Brenner D A. Liver fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115: 208-218 [DOI: 10.1172/JCI200524282]
- Medina J, Arroyo AG, Sánchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 2004; 39: 1185-1195 [PMID: 15122744 DOI: 10.1002/hep.20193]
- Vanheule E, Geerts AM, Van Huisse J, Schelphout D, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 2008; 89: 419-432 [PMID: 19134051 DOI: 10.1111/j.1365-2613.2008.00608.x]
- Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009; 50: 604-620 [PMID: 19157625 DOI: 10.1016/j.jhep.2008.12.011]
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 化学工业出版社, 2000: 110
- Zheng QA, Li HZ, Zhang YJ, Yang CR. Dracaenogenins A and B, new spirostanols from the red resin of *Dracaena cochinchinensis*. *Steroids* 2006; 71: 160-164 [PMID: 16271273 DOI: 10.1016/j.steroids.2005.09.007]
- 孙晓博, 金描真, 李雪, 金鸽. 龙血竭中龙血素A与龙血素B在大鼠体内的组织分布研究. *广东药学院学报* 2008; 24: 214-216
- 闫波, 陈飞虎, 吴繁荣. 鬼针草总黄酮对肝纤维化大鼠治疗作用及机制探讨. *中国药理学通报* 2008; 24: 1640-1645
- 聂莉, 程德云, 朱刚艳. 龙血竭对肺纤维化大鼠肺组织

#### 同行评价

本文对中药血竭有效成分龙血素抗肝星状细胞的作用加以研究, 研究目标明确, 具有一定的创新性和科学意义.

- 转化生长因子 $\beta 1$  mRNA及 I 型胶原蛋白表达的影响. 河北中医 2010; 32: 1071-1072
- 10 彭伟, 范红, 宋正己. 龙血素B对实验性肝纤维化的干预作用及机制. 中华消化杂志 2010; 30: 129-130
- 11 杨波, 郭建恩, 韩俊婷, 王晓峰, 武冬慧, 赵文杰, 朱铁梁. 龙血素A对大鼠局灶性脑缺血再灌注引起的脑损伤及机制探讨. 中药新药与临床药理 2010; 21: 103-107
- 12 Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *Hepatology* 2007; 45: 817-825 [PMID: 17326208 DOI: 10.1002/hep.21564]
- 13 刘晓强, 周海中, 吴靖珍. 肝病患者血清HA、PC-III、C-IV、LN测定的临床意义. 实用临床医药杂志 2009; 13: 40-42
- 14 Fong GH. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis* 2008; 11: 121-140 [PMID: 18327686 DOI: 10.1007/s10456-008-9107-3]
- 15 吕靖, 陆雄, 陶艳艳, 赵志敏, 刘成海. 肝纤维化小鼠肝组织血管新生特点及其形成机制. 肝脏 2011; 16: 35-40
- 16 Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinnman N, Rey C, Poupon R, Housset C, Rosmorduc O. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35: 1010-1021 [PMID: 11981751 DOI: 10.1053/jhep.2002.32524]

编辑 翟欢欢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

## 《世界华人消化杂志》正文要求

**本刊讯** 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文. 以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按 ●、○、■、□、▲、△ 顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套  $P$  值, 则 <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 第 3 套为 <sup>e</sup> $P < 0.05$ , <sup>f</sup> $P < 0.01$ .  $P$  值后注明何种检验及其具体数字, 如  $P < 0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用  $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$  表达. 黑白图请附黑白照片, 并拷入光盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小  $7.5 \text{ cm} \times 4.5 \text{ cm}$ , 必须使用双面胶条粘贴在正文内, 不能使用浆糊粘贴. (5) 志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐.

# 三种消化道重建术对非肥胖性2型糖尿病患者糖脂代谢的影响

胡东平, 成晓舟, 景武堂, 赖瑞敏, 郭天康

胡东平, 成晓舟, 景武堂, 赖瑞敏, 兰州大学第一临床医学院  
甘肃省兰州市 730000  
郭天康, 甘肃省人民医院普外科 甘肃省兰州市 730000  
胡东平, 硕士, 主要从事消化系手术治疗糖尿病方面的研究。  
作者贡献分布: 本文的主要实验、临床资料整理、数据分析、  
文章起草由胡东平完成; 病例选择、样本取材由胡东平、成晓舟、  
景武堂及赖瑞敏完成; 课题设计、文章修改及审阅由郭天康完成。  
通讯作者: 郭天康, 教授, 730000, 甘肃省兰州市城关区东岗西  
路204号, 甘肃省人民医院普外科. gsguotiankang@sohu.com  
电话: 0931-8281969  
收稿日期: 2012-10-12 修回日期: 2012-10-31  
接受日期: 2012-12-17 在线出版日期: 2013-01-08

## Impact of 3 kinds of digestive tract reconstruction on carbohydrate and lipid metabolism in non-obese type 2 diabetes mellitus patients

Dong-Ping Hu, Xiao-Zhou Cheng, Wu-Tang Jing, Rui-Ming Lai, Tian-Kang Guo

Dong-Ping Hu, Xiao-Zhou Cheng, Wu-Tang Jing, Rui-Ming Lai, the First Clinical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China  
Tian-Kang Guo, Department of General Surgery, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000, Gansu Province, China  
Correspondence to: Tian-Kang Guo, Professor, Department of General Surgery, Gansu Provincial People's Hospital, 204 Donggang West Road, Chengguan District, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. gsguotiankang@sohu.com  
Received: 2012-10-12 Revised: 2012-10-31  
Accepted: 2012-12-17 Published online: 2013-01-08

### Abstract

**AIM:** To evaluate the effect of three digestive tract reconstruction procedures on carbohydrate and lipid metabolism in non-obese patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM).

**METHODS:** Clinical data for 39 patients who underwent Billroth I anastomosis (10 cases), Billroth II anastomosis (13 cases) or Roux-en-Y anastomosis (13 cases) in the Department of General Surgery, Gansu Provincial People's Hospital from July 2008 to May 2011 were reviewed.

Clinical outcomes were assessed and compared between the three groups.

**RESULTS:** All patients recovered without major complications. Compared to preoperative levels, postoperative levels of FPG, GHbA1c, TG, TC and LDL-c decreased by 2.6 mmol/L  $\pm$  0.7 mmol/L, (2.1  $\pm$  0.7)%, 1.5 mmol/L  $\pm$  0.5 mmol/L, 0.8 mmol/L  $\pm$  0.3 mmol/L, and 1.0 mmol/L  $\pm$  0.4 mmol/L, respectively, while postoperative levels of HDL-c, Fins and FC-p increased by 0.3 mmol/L  $\pm$  0.07 mmol/L, 6.1 mU/L  $\pm$  3.2 mU/L and 0.28 nmol/L  $\pm$  0.06 nmol/L. Postoperative levels of FPG, GHbA1c, TG and LDL-c in patients undergoing Roux-en-Y anastomosis were much lower than those in other two groups (all  $P < 0.05$ ). Without any drug treatment and special diet, Billroth I anastomosis, Billroth II anastomosis and Roux-en-Y anastomosis improved glycolipid abnormality in 40%, 69.2% and 81.3% of patients, respectively.

**CONCLUSION:** All three digestive tract reconstruction procedures can improve carbohydrate and lipid metabolism in non-obese T2DM patients.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Digestive system surgical procedures; Type 2 diabetes mellitus; Glucose metabolism disorders; Lipid metabolism disorders.

Hu DP, Cheng XZ, Jing WT, Lai RM, Guo TK. Impact of 3 kinds of digestive tract reconstruction on carbohydrate and lipid metabolism in non-obese type 2 diabetes mellitus patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 93-97

### 摘要

**目的:** 探讨三种消化道重建术对非肥胖性2型糖尿病患者糖脂代谢的影响。

**方法:** 回顾性分析2008-02/2011-05在甘肃省人民医院普外科接受Billroth I术(10)、Billroth

### 背景资料

糖尿病是严重危害人类健康的慢性代谢性疾病,我国患病人群高达9 240万位居全球之首。目前糖尿病的治疗主要以饮食、运动和药物为主,但是疗效不佳,费用昂贵。近年来临床发现,通过消化道重建术可改善糖尿病患者糖脂代谢异常,而逆转糖尿病的各种并发症并使其治愈,但治疗机制目前尚不明确,有待进一步研究。

### 同行评议者

于则利,教授,首都医科大学附属北京同仁医院外科

### ■相关报道

张新国和王湘辉等报道证实, 消化道重建术可以改善非肥胖性2型糖尿病患者的糖脂代谢异常, 能明显降低糖尿病并发症的发生率, 值得临床研究。

II术(13)和Roux-en-Y术(16)治疗的39例合并有2型糖尿病患者临床资料, 比较3组手术治疗非肥胖性2型糖尿病的临床结局。

**结果:** 39例患者术后均无严重并发症, 3组术式术前与术后检测指标比较空腹血糖、糖化血红蛋白、总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白下降分别为2.6 mmol/L $\pm$ 0.7 mmol/L、2.1% $\pm$ 0.7%、1.5 mmol/L $\pm$ 0.5 mmol/L、0.8 mmol/L $\pm$ 0.3 mmol/L和1.0 mmol/L $\pm$ 0.4 mmol/L, 高密度脂蛋白、空腹胰岛素和空腹C肽增高分别为0.3 mmol/L $\pm$ 0.07 mmol/L、6.1 mU/L $\pm$ 3.2 mU/L、0.28 nmol/L $\pm$ 0.06 nmol/L。3组术式组内比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。3组术式组间比较, Roux-en-Y术组术后空腹血糖、糖化血红蛋白、甘油三酯和低密度脂蛋白均降至正常, 与其他两组组间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。术后在不需要药物和饮食控制的情况下Billroth I术、Billroth II术和Roux-en-Y术改善患者糖脂异常的有效率分别为40.0%、69.2%和81.3%。

**结论:** 三种消化道重建术可改善非肥胖性2型糖尿病患者糖脂代谢异常, 机制尚不完全明确。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 消化系统外科手术; 2型糖尿病; 葡萄糖代谢障碍; 脂质代谢障碍

胡东平, 成晓舟, 景武堂, 赖瑞敏, 郭天康. 三种消化道重建术对非肥胖性2型糖尿病患者糖脂代谢的影响. 世界华人消化杂志 2013; 21(1): 93-97

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/93.asp>

## 0 引言

糖尿病是一组严重危害人类健康的慢性代谢性疾病, 目前全世界患病人数达1.5亿, 有研究预计到2030年将增至4.39亿<sup>[1]</sup>, 其中2型糖尿病占据本病群体的95%<sup>[2]</sup>, 且此型通常合并有肥胖和高血脂症, 又称其为“糖脂病”。近年来大量研究资料证明, 在临床应用减肥手术治疗肥胖症的同时, 人们惊奇的发现很多患者的2型糖尿病也被同时治愈或好转<sup>[3,4]</sup>, 这一发现使得人们对糖尿病的治疗有了新的认识。在欧美应用消化道重建术治疗肥胖合并2型糖尿病已经被广泛接受, 由于亚洲与欧美人群的体型差异, 在我国主要以非肥胖性2型糖尿病患者为主。因此, 本研究收集了Billroth I术、Billroth II术和Roux-en-Y术治疗合并患有非肥胖性2型糖尿病患者的临

表 1 3组患者术前基本资料 ( $n = 39$ , mean  $\pm$  SD)

	Billroth I	Billroth II	Roux-en-Y
年龄(岁)	45.7 $\pm$ 10.9	47.2 $\pm$ 11.3	50.4 $\pm$ 6.2
n(男/女)	10(6/4)	13(8/5)	16(10/6)
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	27.3 $\pm$ 2.4	23.9 $\pm$ 4.1	25.2 $\pm$ 3.6
糖尿病病史(年)	4.5 $\pm$ 1.2	5.1 $\pm$ 0.9	4.9 $\pm$ 1.3
高血压[n(%)]	4(40)	6(46.2)	8(50.0)
高脂血症[n(%)]	5(50)	6(46.2)	9(56.5)
术前糖尿病治疗			
饮食与运动[n(%)]	3(30)	2(15.4)	3(18.8)
口服降糖药[n(%)]	5(50)	7(53.8)	8(50.0)
胰岛素[n(%)]	2(20)	4(30.8)	5(31.2)

床资料, 对其疗效进行分析, 探讨3组术式在治疗非肥胖性2型糖尿病中的应用价值, 以期为消化道重建术在控制血糖和降低血脂方面提供临床依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我们收集了2008-02/2011-05在甘肃省人民医院收治胃癌、胃肠道间质瘤和消化道溃疡合并2型糖尿病的非肥胖患者39例, 分别按照不同原发病接受Billroth I术式10例、Billroth II术式13例及Roux-en-Y术式16例的治疗, 其中女15例, 男24例, 3组术前基本资料比较见表1。该研究获得医院伦理委员会的通论批准, 患者均知情同意。

### 1.2 方法

**1.2.1 入选及排除标准:** 入选标准: (1)符合2006年美国糖尿病协会(ADA)关于2型糖尿病的诊断标准, 空腹血糖 $\geq 126$  g/L(7.0 mmol/L)或糖尿病症状+随机血糖 $> 200$  g/L(11.1 mmol/L); (2)有确切的2型糖尿病病史并在术前仍进行内科治疗; (3)总胆固醇 $> 5.72$  mmol/L, 甘油三酯 $> 1.70$  mmol/L; (4)体质指数 $\leq 30$  kg/m<sup>2</sup>非肥胖者; (5)随访至少12 mo者; (6)所有患者均符合原发病的手术适应症。排除标准: (1)合并严重心、肺、肝、肾功能不全者及伴严重的糖尿病并发症不能耐受手术; (2)病情严重如肿瘤远处转移失去手术机会; (3)体指数 $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>肥胖症; (4)1型糖尿病患者; (5)随访少于12 mo或失访者。

**1.2.2 术前准备:** 详细询问病史, 全面系统检查。术前测定血糖、尿糖、酮体、糖化血红蛋白、电解质及血脂等, 并进行心脏、肝脏和肾脏功能方面检查。病情轻者无需特殊处理, 病情较重需口服降糖药或应用长效胰岛素者, 在术前1 d

**■创新盘点**  
本研究应用不同消化道重建术对非肥胖性2型糖尿病患者血糖和血脂的疗效进行比较, 对糖尿病的手术治疗有指导意义, 目前国内尚无类似研究。

表 2 各组患者糖代谢指标变化的比较 (n = 39, mean ± SD)

分组	n	空腹血糖(mmol/L)		糖化血红蛋白(%)		空腹胰岛素(mU/L)		空腹C肽(nmol/L)	
		术前	术后	术前	术后	术前	术后	术前	术后
Bilroth I 组	10	8.9±1.3	6.8±0.7 <sup>bd</sup>	8.7±1.1	7.0±0.7 <sup>c</sup>	15.3±4.3	18.2±5.0	0.46±0.30	0.69±0.30 <sup>c</sup>
Bilroth II 组	13	8.8±1.6	6.2±0.9 <sup>b</sup>	8.1±0.9	6.0±0.6 <sup>b</sup>	13.6±3.6	19.0±6.0 <sup>b</sup>	0.60±0.30	0.83±0.40 <sup>a</sup>
Roux-en-Y组	16	9.1±1.1	5.8±0.9 <sup>b</sup>	8.7±1.0	5.8±0.8 <sup>b</sup>	13.0±3.4	18.2±5.2 <sup>b</sup>	0.50±0.34	0.80±0.29 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 术前组; <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs Roux-en-Y组。

表 3 各组患者糖代谢指标变化的比较 (n = 39, mean ± SD, mmol/L)

分组	n	甘油三酯		总胆固醇		低密度脂蛋白		高密度脂蛋白	
		术前	术后	术前	术后	术前	术后	术前	术后
Bilroth I 组	10	2.5±0.7	1.7±0.6 <sup>bc</sup>	5.7±0.6	5.0±0.4 <sup>bc</sup>	4.0±0.5	3.4±0.5 <sup>b</sup>	1.23±0.50	1.40±0.43 <sup>a</sup>
Bilroth II 组	13	2.4±0.9	2.4±0.9	5.9±0.9	4.6±0.4 <sup>b</sup>	4.0±0.7	3.0±0.3 <sup>bd</sup>	1.20±0.46	1.50±0.41 <sup>a</sup>
Roux-en-Y组	16	2.6±0.9	1.2±0.5 <sup>b</sup>	5.9±1.1	4.5±0.6 <sup>b</sup>	4.1±0.7	2.7±0.4 <sup>b</sup>	1.30±0.50	1.80±0.36 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 术前组; <sup>c</sup>P<0.05, <sup>d</sup>P<0.01 vs Roux-en-Y组。

改用普通胰岛素, 使空腹血糖控制在8.9 mmol/L以下, 24 h尿糖定量低于10 g。术后根据患者个体差异调整用药, 若空腹血糖>7.0 mmol/L时则给予短效胰岛素处理。该研究获得医院伦理委员会的讨论批准, 患者均知情同意。

**1.2.3 手术方式:** 所有患者均在全麻下行开腹部分胃或全胃切除消化道重建术及相关疾病的根治术。(1)Billroth I 吻合术: 远端胃大部分切除后, 将残胃与十二指肠吻合;(2)Billroth II 吻合术: 切除远端胃后, 缝闭十二指肠残端, 将残胃与距Treitz韧带远端约20 cm处的上段空肠行端侧吻合;(3)Roux-en-Y吻合术: 距Treitz韧带远端约10-15 cm处切断空肠, 缝合关闭十二指肠残端, 将残胃或食管与远端空肠吻合, 在距此吻合45-60 cm处行空肠-空肠端侧吻合。

**1.2.4 检测指标:** 分别于术前, 术后检测患者空腹血糖、糖化血红蛋白、空腹胰岛素、空腹C肽、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白等疗效指标。

**1.2.5 疗效判断:** 参照2010年《中国2型糖尿病防治指南》的控制标准, 以空腹血糖、糖化血红蛋白、总胆固醇和甘油三酯为术后治愈和好转的参考指标。(1)治愈标准: 在不使用任何降糖降脂药物的情况下, 空腹血糖≤6.5%、糖化血红蛋白≤7.0 mmol/L、总胆固醇<4.5 mmol/L和甘油三酯<1.5 mmol/L;(2)好转标准: 空腹血糖值较术前降低50%、糖化血红蛋白下降≥1%、总胆固

醇≥4.5 mmol/L和甘油三酯<2.2 mmol/L, 或降糖降脂药物使用剂量减少一半;(3)无效标准: 空腹血糖值无变化或未降低50%、糖化血红蛋白下降值<1%、总胆固醇≥6.0 mmol/L和甘油三酯≥2.2 mmol/L, 与术前相比用药种类或剂量增加。

**1.2.6 随访:** 由我院病案室协助我们完成39例病例的随访, 随访采用定期复查及电话询问患者或家属, 随访问隔6 mo。所有患者均完成随访无失访, 随访最短13 mo, 最长24 mo。

**统计学处理** 采用SPSS18.0统计软件处理数据, 结果中定量值以mean±SD表示, 定性值以例数和百分比表示。3组采用独立样本t检验的方法, 以P≤0.05表示差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 术后一般情况** 39例患者术后发生吻合口漏1例、肠梗阻1例和切口愈合延期5例, 积极治疗后均痊愈, 无严重并发症。

**2.2 血糖血脂检测结果的比较** 三种消化道重建术对非肥胖性2型糖尿病患者术前、术后血糖血脂生化指标的结果比较见表2和表3。各组术前与术后检测指标比较; 空腹血糖、糖化血红蛋白、总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白均明显下降(P<0.05, 表2), 高密度脂蛋白、空腹胰岛素和空腹C肽显著增高(P<0.05, 表3), 3组术式组内比较差异有统计学意义(P<0.05)。3组术式组间比较, Roux-en-Y术组术后空腹血糖、糖

### ■应用要点

由于非肥胖性2型糖尿病患者应用手术治疗的适应证仍然存在争议,还处于科学研究阶段。因此,该手术应用于临床实践的治疗还有待进一步研究。

表 4 3组患者术后糖脂代谢情况

分组	n	有效		无效		
		治愈	好转	有效率(%)	无效	无效率(%)
Billroth I	10	1	3	40.0	6	60.0
Billroth II	13	3	6	69.2	4	30.8
Roux-en-Y	16	5	8	81.3	3	18.7

化血红蛋白、甘油三酯和低密度脂蛋白均降至正常,与其他两组组间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

2.3 术后糖脂代谢恢复情况 术后12 mo复查患者血糖血脂,在不需任何药物治疗和特殊饮食的情况下, Billroth I 术、Billroth II 术和Roux-en-Y 术改善患者糖脂异常的有效率分别为40.0%、69.2%和81.3%(表4)。

### 3 讨论

随着外科手术治疗2型糖尿病的不断发展和其深入研究,有关消化道重建术治疗2型糖尿病的研究已成为国际热点<sup>[5,6]</sup>。近年来有部分学者,已将手术治疗肥胖性2型糖尿病的成功经验应用于非肥胖性2型糖尿病患者,并取得了显著疗效<sup>[7]</sup>。目前虽然缺乏大样本量随机对照试验,但有研究通过短期随访已经证实,消化道重建术在改善非肥胖性2型糖尿病患者的糖脂异常代谢方面均有显著疗效<sup>[8]</sup>。

为了对比三种消化道重建术式对非肥胖性2型糖尿病的疗效及其可能机理,本研究应用近似于减肥手术的Billroth I 术、Billroth II 术和Roux-en-Y 术为研究手段,系统地对比了术前及术后3组患者空腹血糖、糖化血红蛋白、空腹胰岛素、空腹C肽、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白以及体质量、身体质量指数(body mass index, BMI)和术后降糖药物治疗的变化。在术后2年随访期间,所有患者在没有使用任何降糖降脂药物的情况下, Billroth I 术组、Billroth II 术组和Roux-en-Y 术组术后降糖降脂的有效率分别为40.0%、69.2%和81.3%。患者体质量和BMI与术前相比变化不明显,手术治疗糖尿病使患者血糖血脂改善的作用与体质量和BMI下降的相关性不大,这一研究与张新国等<sup>[9]</sup>和王湘辉等<sup>[10]</sup>在临床上应用胃转流术治疗非肥胖型2型糖尿病结果近似。

术后Billroth II 术组和Roux-en-Y 术组患者的空腹血糖和糖化血红蛋白均恢复到正常水

平,空腹胰岛素和空腹C肽略有升高。本研究揭示上述两种术式旷置十二指肠和近端空肠,一方面使未经消化的食物提早进入低位肠段,预先刺激其肠道黏膜细胞,使得肠道分泌的细胞因子胰岛素生长因子-1(insulin-like growth factor, IGF-1)和胰高血糖素样多肽-1(Glucagon like peptide-1, GLP-1)分泌增多,从而促进糖原合成,抑制胰高血糖素的分泌;此外GLP-1增加了胰岛素前体的合成和胰岛素的基因表达,促进胰岛β细胞的增生与抑制其凋亡<sup>[11,12]</sup>。另一方面食物无法通过十二指肠和近端空肠,使其肠道细胞因子胃抑肽分泌减少,胰岛抵抗被解除<sup>[13]</sup>。在血脂方面甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白均有明显降低,高密度脂蛋白增高显著。患者术后血脂改善考虑有以下原因:首先食物提前进入小肠远端,刺激黏膜壁细胞分泌某些肠道激素,这些激素可促进脂肪细胞分解,降低食欲、减少饮食摄入而改善脂质代谢<sup>[14]</sup>;其次消化道重建术改变了食物的生理流向,使得肠道吸收功能受限;最后可能与术后由于机体处于应激状态,消耗了大量脂肪和蛋白质储备有关。Billroth I 术保持了原有上消化道的生理解剖功能,仅属于限制饮食故降糖降脂效果不明显。综上所述,基于前期动物实验和临床研究,我们分析消化道重建术改善糖脂代谢的机理,可能是手术改变了胃、十二指肠及上段空肠原有的正常解剖及其生理功能,使其重建了胃肠道消化和内分泌功能的动态平衡,才使得2型糖尿病患者的糖脂异常获得临床治疗作用<sup>[15]</sup>。

总之,三种消化道重建术可改善非肥胖性2型糖尿病患者的糖脂代谢异常,其中以Billroth II 术和Roux-en-Y 术的近期疗效较为明显,提示我们消化道重建术可能是治疗2型糖尿病的一种有效方法。最后应该提及,由于目前手术治疗非肥胖性2型糖尿病的适应证仍存在争议,还处于科学研究阶段。因此,该手术在临床实践的应用还有待进一步研究。

### 4 参考文献

- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87: 4-14 [PMID: 19896746 DOI: 10.1016/j.diabres.2009.10.007]
- Rubino F. Is type 2 diabetes an operable intestinal disease? A provocative yet reasonable hypothesis. *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 2: S290-S296 [PMID: 18227499 DOI: 10.2337/dc08-s271]
- Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or

insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UK-PDS) Group. *JAMA* 1999; 281: 2005-2012 [PMID: 10359389 DOI: 10.1001/jama.281.21.2005]

4 Fried M, Ribaric G, Buchwald JN, Svacina S, Dolezalova K, Scopinaro N. Metabolic surgery for the treatment of type 2 diabetes in patients with BMI &lt;lt; 35 kg/m<sup>2</sup>: an integrative review of early studies. *Obes Surg* 2010; 20: 776-790 [PMID: 20333558 DOI: 10.1007/s11695-010-0113-3]

5 Lee WJ, Chong K, Ser KH, Lee YC, Chen SC, Chen JC, Tsai MH, Chuang LM. Gastric bypass vs sleeve gastrectomy for type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Arch Surg* 2011; 146: 143-148 [PMID: 21339423 DOI: 10.1001/archsurg.2010.326]

6 Cummings DE, Overduin J, Foster-Schubert KE. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2608-2615 [PMID: 15181031 DOI: 10.1210/jc.2004-0433]

7 Greenway SE, Greenway FL, Klein S. Effects of obesity surgery on non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arch Surg* 2002; 137: 1109-1117 [PMID: 12361414 DOI: 10.1001/archsurg.137.10.1109]

8 李杭, 张红亚, 梁炜. Roux-en-Y胃肠道重建改善非肥胖性糖尿病胃癌患者的糖脂代谢. *中华普通外科杂志* 2010; 25: 5

9 张新国, 杨学军, 徐红. 胃旁路手术治疗 II 型糖尿病的体会. *中华普通外科杂志* 2006; 20: 599-599

10 王湘辉, 李涛, 王海忠. Roux-en-Y胃转流术治疗 II 型糖尿病. *西北国防医学杂志* 2006; 27: 2

11 Mason EE. Ileal [correction of ilial] transposition and enteroglucagon/GLP-1 in obesity (and diabetic?) surgery. *Obes Surg* 1999; 9: 223-228 [PMID: 10484306 DOI: 10.1381/096089299765553070]

12 Suzuki S, Ramos EJ, Goncalves CG, Chen C, Meguid MM. Changes in GI hormones and their effect on gastric emptying and transit times after Roux-en-Y gastric bypass in rat model. *Surgery* 2005; 138: 283-290 [PMID: 16153438 DOI: 10.1016/j.surg.2005.05.013]

13 Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 2006; 444: 854-859 [PMID: 17167473 DOI: 10.1038/nature05484]

14 Rodieux F, Giusti V, D'Alessio DA, Suter M, Tappy L. Effects of gastric bypass and gastric banding on glucose kinetics and gut hormone release. *Obesity* (Silver Spring) 2008; 16: 298-305 [PMID: 18239636 DOI: 10.1038/oby.2007.83]

15 Schwarz A, Büchler M, Usinger K, Rieger H, Glasbrenner B, Friess H, Kunz R, Beger HG. Importance of the duodenal passage and pouch volume after total gastrectomy and reconstruction with the Ulm pouch: prospective randomized clinical study. *World J Surg* 1996; 20: 60-66; discussion 66-67 [PMID: 8588415 DOI: 10.1007/s002689900011]

■同行评价  
文章题材较新颖, 符合临床实际, 对进一步研究糖尿病的胃肠道手术治疗有一定借鉴价值。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界华人消化杂志》  
影响因子 0.775

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布.《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2011年《世界华人消化杂志》总被引频次3871次, 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第5位、第7位、第5位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第65位、第238位、第138位; 其他指标: 即年指标0.081, 他引率0.82, 引用刊数526种, 扩散因子13.59, 权威因子1260.02, 被引半衰期4.3, 来源文献量642, 文献选出率0.93, 地区分布数29, 机构分布数302, 基金论文比0.45, 海外论文比0.01.

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界华人消化杂志》再度被收录为“中国科技核心期刊”(《世界华人消化杂志》编辑部).





# 以消化系症状为首发表现的系统性红斑狼疮1例

陈迪诗, 曾飞, 毛胜勋, 林静, 勒义官

## ■背景资料

SLE临床上多以关节、皮肤、肾脏等组织器官受累为首发表现, 以消化系症状为首发表现较少见, 而因SLE所致的IPO更为少见。

陈迪诗, 曾飞, 毛胜勋, 勒义官, 南昌大学第二附属医院胃肠外科 江西省南昌市 330006

林静, 孝昌县第一人民医院内二科 湖北省孝感市 432900

陈迪诗, 在读研究生, 主要从事胃肠道疾病的研究。

作者贡献分布: 本文由陈迪诗、林静及勒义官收集资料; 陈迪诗撰写; 曾飞与毛胜勋负责校审。

通讯作者: 曾飞, 主任医师, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 江西省南昌大学第二附属医院胃肠外科. zenfei6405@126.com  
收稿日期: 2012-08-01 修回日期: 2012-12-18

接受日期: 2012-12-20 在线出版日期: 2013-01-08

## Systemic lupus erythematosus with gastrointestinal symptoms as the first manifestation: A case report

Di-Shi Chen, Fei Zeng, Sheng-Xun Mao, Jing Lin, Yi-Guan Le

Di-Shi Chen, Fei Zeng, Sheng-Xun Mao, Yi-Guan Le, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Jing Lin, Department of Internal Medicine, the First People's Hospital of Xiaochang, Xiaogan 432900, Hubei Province, China  
Correspondence to: Fei Zeng, Chief Physician, Department of Internal Medicine, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, 1 Minde Road, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. zenfei6405@126.com

Received: 2012-08-01 Revised: 2012-12-18

Accepted: 2012-12-20 Published online: 2013-01-08

## Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) presenting with gastrointestinal symptoms is rare, and SLE with gastrointestinal symptoms as the first manifestation is an even rarer condition. Here we report a case of SLE with gastrointestinal symptoms as the first manifestation in a 28-years-old woman. She developed abdominal pain, diarrhea, nausea and vomiting about a month ago. An abdominal CT scan demonstrated intestinal obstruction, ascites and marked edematous thickening of the bowel wall, which appeared as "target sign", "double-track sign" and "comb-like sign". Laboratory tests showed that her serum complement levels decreased and that she was positive for anti-nRNP/Sm antibodies, anti-Sm antibodies, anti-SS-A antibody, and anti-nuclear antibodies. Treatment consisting of high dose glucocorticoids and cyclophosphamide led to rapid remission of both digestive tract and

urinary tract symptoms.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** Digestive system; Urinary system; Symptom; Systemic lupus erythematosus

Chen DS, Zeng F, Mao SX, Lin J, Le YG. Systemic lupus erythematosus with gastrointestinal symptoms as the first manifestation: A case report. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(1): 98-101

## 摘要

系统性红斑狼疮累及消化系的报道较少, 而以消化系症状为首发表现的报道更是少见。现报道以消化系症状为首发表现且病程中出现假性肠梗阻的系统性红斑狼疮1例; 患者, 女, 28岁, 因“腹痛、呕吐、腹泻”1月余入院, 腹部CT检查示肠梗阻、腹水及肠壁明显水肿、增厚并分层强化呈环形的“靶征”、“双轨征”及“梳状征”; 实验室检查IgA、IgG升高, 补体C3、C4下降, 抗nRNP/Sm抗体、抗Sm抗体、抗SS-A抗体、抗核抗体均阳性, 病程中出现泌尿系统受累表现; 经糖皮质激素及环磷酰胺治疗后病情缓解。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** 消化系统; 泌尿系统; 症状; 系统性红斑狼疮

陈迪诗, 曾飞, 毛胜勋, 林静, 勒义官. 以消化系症状为首发表现的系统性红斑狼疮1例. *世界华人消化杂志* 2013; 21(1): 98-101  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/98.asp>

## 0 引言

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种自身免疫介导的, 以免疫性炎症为突出表现的弥漫性结缔组织病. 本病易发于生育年龄女性, 患者体内存在多种自身抗体, 可先后或同时导致多个器官、系统受累, 临床表现复杂多样, 极易误诊. 现报道1例我院新近收治的以消化系症状为首发表现, 病程中出现假性肠梗阻(intestinal pseudo-obstruction, IPO), 最后确诊为SLE的产褥期内妇女病例, 以提高临床医师特别是胃肠外科医师对本病的重视, 避免不

## ■同行评议者

毛高平, 教授, 中国人民解放军空军总医院





图 1 CT平扫示肠管肠壁弥漫性水肿增厚.



图 3 腹部CTA示小肠呈双轨征(箭).

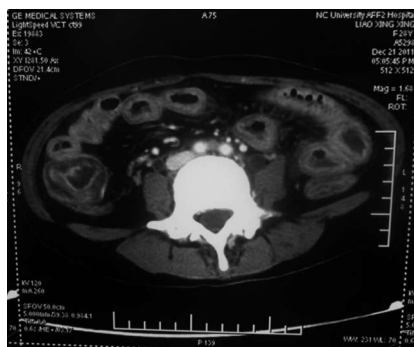


图 2 腹部CTA示肠壁明显水肿、增厚、分层呈明显的靶征.



图 4 腹部CTA示肠系膜血管充血呈梳状征(箭).

**■相关报道**  
 国内外文献报道当SLE以消化系症状为首表现时,误诊率极高,能否早期诊断,对患者的病情转归起决定性作用.

恰当的手术治疗,减少不良预后的发生.

### 1 病例报告

女, 28岁, 因“腹痛、呕吐、腹泻”1 mo余于2011-12-21入院. 患者自诉1 mo前无明显诱因突发下腹阵发性绞痛, 伴恶心呕吐及腹泻, 在外院诊断考虑为急性胃肠炎、急性腹膜炎和急性盆腔炎, 给予对症治疗后症状改善不明显, 为求进一步诊治遂入我院消化内科. 起病以来患者精神、饮食、睡眠较差、小便正常, 体质量下降达10 kg. 既往史: 既往无类似症状发作史, 50 d前曾有剖宫产手术史; 月经史: 无异常; 家族史: 无家族性遗传病史.

入院查体: T 37.0 °C、P 110次/min、R 20次/min、BP 120/0 mmHg, 发育正常, 营养一般, 急性病容, 对答切题, 查体合作. 心肺无明显异常, 腹平, 下腹部可见一长约12 cm的手术疤痕. 腹肌软, 上腹部及脐周轻压痛, 无反跳痛, 肝脾肋下未及, 墨菲氏征(Murphy征)阴性, 移动性浊音阴性, 肾区无叩痛. 肠鸣音活跃(11次/min).

入院后查血常规示: 白细胞 $9.0 \times 10^9/L$ 、血红蛋白123 g/L, 尿液分析示: 蛋白质(++), 电解质: 钾2.6 mmol/L, 腹部CT示: 全腹部肠壁弥漫性水肿、增厚, 盆腔少量积液(图1). 腹部CTA示: 腹主动脉及其分支未见异常征象, 肠管明显增厚、水肿, 腹腔积液(图2-4).

入院后拟诊为腹痛待查: 急性胃肠炎、低钾血症. 给予纠正电解质平衡、补液、抑酸、生长抑素、抗炎和营养支持等治疗. 2011-12-22患者腹痛转移至右下腹且疼痛剧烈, 呕吐、腹泻依旧, 查体: 生命体征平稳, 痛苦面容, 腹平软, 下腹部压痛, 以右下腹为甚, 反跳痛可疑, 移动性浊音阴性, 肠鸣音活跃. 考虑患者有转移性右下腹痛, 呕吐及腹泻, 为急性阑尾炎可能性大, 于2011-12-22下午转入胃肠外科. 转入胃肠外科后考虑到患者病程长, 体温血象不高及CT检查阑尾未见明显异常, 诊断不明确, 暂不具有手术指征而继续行上述保守治疗.

2011-12-23/29除患者精神稍有好转外, 腹痛呕吐腹泻无明显好转, 期间请妇产科会诊排除了妇科疾病, 并多次复查尿常规、粪便常规及潜血未见异常, 白细胞从入院时 $9.0 \times 10^9/L$ 逐渐降至 $3.5 \times 10^9/L$ , 血红蛋白从123 g/L逐渐降至84 g/L, 血钾从2.6 mmol/L, 逐渐升至5.1 mmol/L. 2011-12-30患者腹痛依旧, 腹泻及呕吐次数开始减少, 但开始出现尿频尿急, 可达15次/d以上. 2012-01-01患者开始出现腹胀胸闷, 腹泻次数减为3-4次/d. 2012-01-02患者腹痛腹胀加重, 出现肛门停止排便排气. 查体: 生命体征平稳, 腹胀膨隆, 腹肌软, 全腹压痛, 反跳痛可疑, 移动性浊音阴性,

**■创新盘点**  
 本文提出了当出现不明原因的消化系症状, 诊断较为棘手时, 特别是腹部CT增强扫描出现“靶征”、“双掌征”及“梳状征”时, 应尽早行免疫学检查, 以排除SLE可能.



突出表现的SLE的早期诊断有一定的特异性。宋彬等<sup>[13]</sup>报道了因急性腹痛而行腹部CT扫描的23例SLE患者中, 19例出现肠壁肿胀、增厚, 12例出现“靶征”, 16例存在肠管扩张, 21例出现肠系膜肿胀和脂肪密度增高, 4例肠系膜血管呈“梳状征”。任小军等<sup>[14]</sup>报道了以消化系症状为首表现最后确诊为SLE的8例患者行CT增强扫描, CT表现为8例均有空肠及回肠肠壁水肿、增厚并分层强化, 呈环形的“靶征”或“双轨征”或“梳状征”。本例患者入院时行腹部CTA检查未见腹主动脉及其分支异常, 但可见壁水肿、增厚并分层强化, 呈环形的“靶征”和“双轨征”及肠系膜血管呈“梳状”改变, 最后确诊为SLE。个人认为虽然CT增强扫描出现“靶征”、“双晕征”及“梳状征”不能作为确诊SLE的指征, 因为缺血性肠炎、淀粉样变性病、传染性肠炎及血管神经性水肿等也可以引起小血管炎而累及胃肠道出现类似表现<sup>[15]</sup>, 但当CT增强扫描出现的上述征象时, 可作为早期诊断SLE的一个重要线索。

SLE临床表现多样, 本例SLE患者除有腹痛、腹泻、呕吐及CT增强扫描出现的“靶征”、“双轨征”及“梳状征”等特点外, 还具有以下特点: (1)产褥期内发病, 增加了疾病诊断的难度, 也有学者认为妊娠可以诱发SLE, 特别在妊娠早期和产后6 wk<sup>[16]</sup>; (2)症体分离, 患者诉疼痛明显, 虽有压痛, 但几乎无反跳痛及肌紧张; (3)腹痛及压痛部位不固定; (4)血液系统受累, 患者白细胞从入院时 $9.0 \times 10^9/L$  逐渐降至 $3.5 \times 10^9/L$ , 血红蛋白从123 g/L逐渐降至80 g/L, 短期内出现中度贫血, 考虑为SLE所致, 而非营养不良性贫血; (5)泌尿系统受累, 患者在入院9 d时出现尿频尿急及双侧输尿管扩张, 但无尿痛及尿液细菌培养阴性; (6)浆膜炎, 患者虽无胸膜炎及心包炎但有不能用其他原因解释的腹盆腔积液; (7)IPO, 梗阻发生在低血钾纠正后, 肠鸣音消失。本病例在入院半月才确诊, 这主要是对患者院外诊治1 mo余的病史及查体时非典型蝶形红斑未引起足够的重视, 早期未行免疫学检查有关, 但更主要的是由于SLE首发症状多样, 多系统损害较晚, 临床上缺乏特异性, 以消化系症状为首表现的SLE更是少见有关。因此对临床接诊和收治具有消化系表现但原因不明的患者, 尤其是育龄女性时, 需注意有无颊部红斑、关节痛、肾脏受损等

其他系统受累表现, 特别是腹部CT增强扫描出现“靶征”、“双晕征”及“梳状征”时, 应尽早行免疫学检查, 以排除SLE可能。

### 3 参考文献

- 1 Sultan SM, Ioannou Y, Isenberg DA. A review of gastrointestinal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* (Oxford) 1999; 38: 917-932 [PMID: 10534541 DOI: 10.1093/rheumatology/38.10.917]
- 2 Lee JR, Paik CN, Kim JD, Chung WC, Lee KM, Yang JM. Ischemic colitis associated with intestinal vasculitis: histological proof in systemic lupus erythematosus. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3591-3593 [PMID: 18567093 DOI: 10.3748/wjg.14.3591]
- 3 Kim J, Kim N. Intestinal pseudo-obstruction: initial manifestation of systemic lupus erythematosus. *J Neurogastroenterol Motil* 2011; 17: 423-424 [PMID: 22148114]
- 4 Mok MY, Wong RW, Lau CS. Intestinal pseudo-obstruction in systemic lupus erythematosus: an uncommon but important clinical manifestation. *Lupus* 2000; 9: 11-18 [PMID: 10713642 DOI: 10.1177/09612033000900104]
- 5 Hill PA, Dwyer KM, Power DA. Chronic intestinal pseudo-obstruction in systemic lupus erythematosus due to intestinal smooth muscle myopathy. *Lupus* 2000; 9: 458-463 [PMID: 10981652]
- 6 Malaviya AN, Sharma A, Agarwal D, Kapoor S, Garg S, Singh S, Rawat R. Acute abdomen in SLE. *Int J Rheum Dis* 2011; 14: 98-104 [PMID: 21303489]
- 7 Park FD, Lee JK, Madduri GD, Ghosh P. Generalized megaviscera of lupus: refractory intestinal pseudo-obstruction, ureterohydronephrosis and megacholecystus. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3555-3559 [PMID: 19630114 DOI: 10.3748/wjg.15.3555]
- 8 王斌, 李向培, 汪国生, 厉晓梅. 以消化系统表现为首发症状的系统性红斑狼疮30例临床分析. *中国临床保健杂志* 2009; 12: 37-40
- 9 胡亚荣, 周亚欧, 游运辉, 罗卉, 左晓霞. 以消化系统症状为首表现的系统性红斑狼疮误诊分析. *中国现代医学杂志* 2004; 14: 140-141
- 10 胡大伟, 顾越英, 王元, 鲍春德, 江尧湖, 陈顺乐. 系统性红斑狼疮合并肠假性梗阻12例临床分析. *中华风湿病学杂志* 2004; 8: 227-229
- 11 陈珊宇, 徐建华, 帅宗文, 王芬, 徐胜前, 刘爽. 以肠系膜血管炎为首表现系统性红斑狼疮的诊断. *安徽医药* 2008; 12: 1180-1181
- 12 杨卫平. 系统性红斑狼疮以消化道为主要表现12例临床分析. *中国医师杂志* 2005; 7: 1532-1533
- 13 宋彬, 徐隽, 罗小华, 吴苾, 程燕, 张瑾. 螺旋CT检查在诊断狼疮性缺血性肠病中的价值. *中国普外基础与临床杂志* 2004; 11: 359-363
- 14 任小军, 章士正, 董旦君, 王丽华. 以消化道症状首发的狼疮性肠炎的多层螺旋CT诊断. *中国医学计算机成像杂志* 2008; 14: 320-324
- 15 Kaneko Y, Hirakata M, Suwa A, Satoh S, Nojima T, Ikeda Y, Mimori T. Systemic lupus erythematosus associated with recurrent lupus enteritis and peritonitis. *Clin Rheumatol* 2004; 23: 351-354 [PMID: 15293099]
- 16 叶任高, 陆再英. 内科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 892-897

### ■同行评论

本文以1例患者的临床诊治经验, 结合文献进行了系统的, 较为全面的复习, 对于临床医师, 尤其对消化内科, 胃肠外科医师提高对系统性红斑狼疮的认识, 提高临床诊疗水平大有裨益。

编辑 田滢 电编 鲁亚静



# 《世界华人消化杂志》投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量,对所有来稿均进行同行评议,是一份被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》,《中文核心期刊要目总览(2011年版)》收录的学术期刊。

## 1 投稿总则

1.1 性质 《世界华人消化杂志(*World Chinese Journal of Digestology, WCJD*, ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569)》是一份同行评议和开放获取期刊(Open Access Journal, OAJ), 创始于1993-01-15, 旬刊, 每月8、18和28号出版。《世界华人消化杂志》编辑委员会成员, 由483位专家组成, 分布在30个省市、自治区和特别行政区。

《世界华人消化杂志》的首要任务是出版胃肠病学, 肝病, 消化系内镜学, 消化系外科学, 消化系肿瘤学, 消化系影像学, 消化系介入治疗, 消化系病理学, 消化系感染学, 消化系药理学, 消化系病理生理学, 消化系病理学, 消化系循证医学, 消化系管理学, 胰腺病学, 消化系检验医学, 消化系分子生物学, 消化系免疫学, 消化系微生物学, 消化系遗传学, 消化系转化医学, 消化系诊断学, 消化系治疗学和糖尿病等领域的原始创新性文章, 综述文章和评论性的文章。最终目的是出版高质量的文章, 提高期刊的学术质量, 使之成为指导本领域胃肠病学和肝病实践的重要学术性期刊, 提高消化系疾病的诊断和治疗水平。

《世界华人消化杂志》是由百世登出版集团有限公司(Baishideng Publishing Group, BPG)主办和出版的一份印刷版, 电子版和网络版三种版本的学术类核心期刊, 由北京百世登生物医学科技有限公司生产制作, 所刊载的全部文章存储在《世界华人消化杂志》网站上。OAJ最大的优点是出版快捷, 一次性缴纳出版费, 不受版面和彩色图片限制, 作者文章在更大的空间内得到传播, 全球读者免费获取全文PDF版本, 网络版本和电子期刊。论文出版后, 作者可获得高质量PDF, 包括封面、编委会成员名单、目次、正文和封底, 作为稿酬, 样刊两本。BPG拥有专业的编辑团队, 涵盖科学编辑、语言编辑和电子编辑。目前编辑和出版42种临床医学OAJ期刊, 其中英文版41种, 具备国际一流的编辑与出版水平。

《世界华人消化杂志》被《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》, 《中文核心期刊要目总览(2011年版)》, 《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts

Journals》和《Digital Object Identifier》收录。《世界华人消化杂志》于2012-12-26获得RCCSE中国权威学术期刊(A+)称号。《世界华人消化杂志》在中国科学技术信息研究所, 2012-12-07发布的2011年度《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 总被引频次3871次(他引率0.82), 影响因子0.775, 综合评价总分65.5分, 分别位居内科学研究领域类52种期刊第5位、第7位和第5位, 并荣获2011年度中国精品科技期刊。

1.2 栏目 述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 循证医学, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。

## 2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD50, HBsAg, HCV

RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等. 为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上. 中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤). 通常应小写.

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P<sup>H</sup>, *H. pylori*不能写成HP,  $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T,  $V_{max}$ 不能写成Vmax,  $\mu$ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn. var. *glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq),  $\rho$ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L),  $\phi$ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径),  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ , Vd,  $T_{1/2}$  CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子

量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 $M_r$  30 000或30 kDa(M大写斜体, r小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 $A_r$ (A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-及-后列出. 在±前后均要列出, 如37.6 °C ± 1.2 °C, 45.6岁 ± 24岁, 56.4 d ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为3.56 ng/L ± 0.27 ng/L. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $1 \times 10^{12}/L$ , WBC数用 $1 \times 10^9/L$ , WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L.  $M_r$ 明确的体内物质以nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm × 6 cm × 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO<sub>2</sub>结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B1、维生素B2、维生素B6、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B12用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}$  g与 $5 \times 10^{-7}$  g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量 $\gamma$ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L乙醇; 5% CO<sub>2</sub>, 50 mL/L CO<sub>2</sub>; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm =  $45 \times 10^{-6}$ ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英文大写F; (3)卡方检验用希文小写 $\chi^2$ ; (4)样本的

《世界华人消化杂志》英文摘要被《Chemical Abstracts》, 《EMBASE/Excerpta Medica》, 《Abstracts Journals》和《Digital Object Identifier》收录.

《世界华人消化杂志》编辑部, 100025, 北京市朝阳区, 东四环中路62号, 远洋国际中心D座903室, 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893, Email: wcyj@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com

相关系数用英文小写 $r$ ; (5)自由度用希文小写 $\nu$ ; (6)样本数用英文小写 $n$ ; (7)概率用英文斜体大写 $P$ . 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为 $\text{mean} \pm \text{SD}$ , 平均数±标准误为 $\text{mean} \pm \text{SE}$ . 统计学显著性用 $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$  ( $P > 0.05$  不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则 $^cP < 0.05$ ,  $^dP < 0.01$ ; 第三套为 $^eP < 0.05$ ,  $^fP < 0.01$ 等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 mmol/L  $\pm$  0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 g  $\pm$  420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 kg  $\pm$  0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如8.4 cm  $\pm$  0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48  $\rightarrow$  23.5  $\rightarrow$  24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 $\leq$ 100, 百分数到个位; 101  $\leq$  分母  $\leq$  1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿拉伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用

于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体.

### 3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文作者的署名, 按照国际医学杂志编辑委员会(ICMJE, International Committee of Medical Journal Editors)作者资格标准执行. 作者标准为: (1)对研究的理念和设计、数据的获得、分析和解读做出重大贡献; (2)起草文章, 并对文章的重要的知识内容进行批评性修改; (3)接受对准备发表文章的最后一稿. 作者应符合条件1, 2, 3, 对研究工作有贡献的其他人可放入志谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 《世界华人消化杂志》要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 作者贡献分布 格式如: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川、庞丽娟、陈玲、杨兰、张金芳、齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲、杨兰、张金芳、蒋金芳、杨磊、李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川、杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川、庞丽娟及李洪安完成.

3.6 同行评议者 为了确保刊出文章的质量, 本刊即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 格式如: 房静远, 教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所.

3.7 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No. 30224801

3.8 通讯作者 格式如: 通讯作者: 黄缘, 教授, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室. huang9815@yahoo.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 修回日期:

3.9 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致。

作者 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com

收稿及修回日期 格式如: Received: Revised:

摘要 包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。

3.10 中文摘要 必须在300字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象. 应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写 $P$ , 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值)。

3.11 正文标题层次 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参

考文献. 序号一律左顶格写, 后空1格写标题; 2级标题后空1格接正文. 正文内序号连排用(1), (2), (3). 以下逐条陈述。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾。

图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$ ( $P>0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 $P$ 值, 则<sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ ; 第3套为<sup>e</sup> $P<0.05$ , <sup>f</sup> $P<0.01$ .  $P$ 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P<0.01$ ,  $t = 4.56$  vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、-应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 $t/\text{min}$ ,  $c/(\text{mol/L})$ ,  $p/\text{kPa}$ ,  $V/\text{mL}$ ,  $t/^\circ\text{C}$ 表达。

志谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法, 即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序. 提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映, 并在文内引用处右上角加方括号注明角码. 文中如列作者姓名, 则需在“Pang等”的右上角注角码号; 若正文中仅引用某文献中的论述, 则在该论述的句末右上

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起改为旬刊发行, 每月8、18、28日出版。



《世界华人消化杂志》坚持开放获取(open access, OA)的出版模式, 编辑出版高质量文章, 努力实现编委、作者和读者利益的最大化, 努力推进本学科的繁荣和发展, 向专业化、特色化和品牌化方向迈进。

角注码号. 如马连生<sup>[1]</sup>报告……, 潘伯荣等<sup>[2-5]</sup>认为……; PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed, 《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准, 通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献. 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID和DOI编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页.

5 网络版的发表前链接 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.

## 4 写作格式实例

### 4.1 述评写作格式实例

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

### 4.2 研究原著写作格式实例

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

### 4.3 焦点论坛写作格式实例

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

### 4.4 文献综述写作格式实例

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

### 4.5 研究快报写作格式实例

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

### 4.6 临床经验写作格式实例

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

### 4.7 病例报告写作格式实例

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

## 5 投稿方式

接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail、打印稿. 在线投稿网址: <http://www.baishideng.com/wcjd/ch/index.aspx>. 无法在线提交的通过[submission@wjgnet.com](mailto:submission@wjgnet.com), 电话: 010-8538-1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投

稿须知下载网址<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>. 审稿过程平均时间需要14-28天. 所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审.

## 6 修回稿须知

6.1 修回稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、职称、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部.

6.2 稿件修改 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把退修稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者符合要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回, 所造成的问题由作者承担责任.

6.3 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有.

### 《世界华人消化杂志》编辑部

北京百世登生物医学科技有限公司  
100025, 北京市朝阳区东四环中路62号  
远洋国际中心D座903室  
电话: 010-8538-1892  
传真: 010-8538-1893  
E-mail: [wcjd@wjgnet.com](mailto:wcjd@wjgnet.com)  
<http://www.wjgnet.com>

## 2013年国内国际会议预告

2013-01-24/26

美国临床肿瘤学会胃肠肿瘤(ASCO GI)研讨会  
会议地点: 美国旧金山  
联系方式: www.gicasym.org

2013-02-10/15

2013年肠道微生物组: 免疫网络效应/法规Keystone Symposia  
会议地点: 美国  
联系方式: info@kestonesymposia.org

2013-02-09/12

美国肠外与肠道营养学会(A.S.P.E.N.): 2013临床营养周  
(CNW 2013)  
会议地点: 美国亚利桑那州凤凰城  
联系方式: <http://www.nutritioncare.org/ClinicalNutritionWeek/index.aspx?id=508>

2013-02-22/23

国立压力性溃疡顾问委员会(NPUAP)全国双年会  
会议地点: 美国休斯顿  
联系方式: [http://www.npuap.org/NPUAPnews-Spring11\[1\]](http://www.npuap.org/NPUAPnews-Spring11[1])

2013-02-22/23

迈阿密大学肝胆疾病临床实践会议  
会议地点: 美国  
联系方式: [cme.med.miami.edu/x88.xml](http://cme.med.miami.edu/x88.xml)

2013-03-01/31

2013年北京第七届疝和腹壁外科国际学术研讨会  
会议地点: 北京  
联系方式: zhshfbwkzz@yahoo.com.cn

2013-03-01/04

2013加拿大消化疾病周(CDDW)  
会议地点: 加拿大  
联系方式: [www.cag-acg.org/cddw](http://www.cag-acg.org/cddw)

2013-03-07/10

亚太肝脏研究协会(APASL)第23届会议  
会议地点: 新加坡  
联系方式: [www.apaslconference.org](http://www.apaslconference.org)

2013-03-15/17

2013年腹腔镜胃肠外科高峰论坛  
会议地点: 深圳市  
联系方式: [ewancool@hotmail.com](mailto:ewancool@hotmail.com)

2013-03-14/16

中部外科学会(CSA)2013年会  
会议地点: 美国佛罗里达州阿米莉亚岛  
联系方式: <http://www.centrsurg.org/meeting/futuremtgs.html>

2013-04-12/14

2013中国肛肠创新论坛(CICS)  
会议地点: 北京市  
联系方式: [www.crdinnovation.com](http://www.crdinnovation.com)

2013-04-19/23

2013第2届国际肿瘤学论坛  
会议地点: 瑞士  
联系方式: [cihexpo@163.com](mailto:cihexpo@163.com)

2013-05-23/25

2013第六届世界癌症大会  
会议地点: 西安市  
联系方式: [bithuiyi@163.com](mailto:bithuiyi@163.com)

2013-05-20/22

2013年第三届内分泌与代谢大会  
会议地点: 西安市  
联系方式: [nancy@bitconferences.cn](mailto:nancy@bitconferences.cn)

2013-05-31/06-04

2013美国临床肿瘤协会年会  
会议地点: 美国芝加哥  
联系方式: [yangxinxue999@163.com](mailto:yangxinxue999@163.com)

2013-06-07/09

中国国际肿瘤营养与支持治疗研讨会暨第一届全国肿瘤  
营养与支持治疗学术会议  
会议地点: 武汉市  
联系方式: [csonsc@VIP.163.com](mailto:csonsc@VIP.163.com)

2013-06-21/23

中国消化科学学术论坛  
会议地点: 张家界市  
联系方式: [casgmail@126.com](mailto:casgmail@126.com)

2013-07-13/14

中华医学会2013年肝病与代谢学术研讨会  
会议地点: 银川市  
联系方式: [lilyjia@163.com](mailto:lilyjia@163.com)

2014-09-26/30

第39届欧洲临床肿瘤学会年会  
会议地点: 西班牙  
联系方式: <http://www.esmo.org/events/madrid-2014-esmo-congress.html>

2013-10-18/20

第二十二届亚太抗癌大会  
会议地点: 天津市  
联系方式: [secretariat@apcc2013.com](mailto:secretariat@apcc2013.com)

## 志谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

迟宝荣 教授

吉林大学第一医院消化内科

杜奕奇 副教授

中国人民解放军第二军医大学长海医院

樊红 教授

东南大学医学院, 发育与疾病相关基因教育部重点实验室, 东南大学基础医学院, 遗传与发育生物学系

高英堂 研究员

天津市第三中心医院

郝丽萍 副教授

华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系

何向辉 教授

天津医科大学总医院普通外科

何晓顺 教授

中山大学附属第一医院

黄培林 教授

东南大学肿瘤学

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)总医院消化内科

金瑞教授

首都医科大学附属北京佑安医院消化科

李革 副教授

延边大学附属医院

李健丁 教授

山西医科大学第一医院放射科CT室

李升平 教授

中山大学肿瘤医院肝胆科

李永翔 主任医师

安徽医科大学第一附属医院普外科

刘炳亚 研究员

上海交通大学医学院附属瑞金医院上海消化外科研究所

刘海峰 主任医师

北京市武警总医院消化科

刘杰民 副主任医师

贵州省人民医院消化内镜科

马欣 主任医师

甘肃省人民医院消化科

门秀丽 教授

河北联合大学(原华北煤炭医学院)病理生理学教研室

彭亮 副主任医师

中山大学附属第三医院感染科

秦春宏 副主任医师

南华大学附属第二医院普外科

任浩 副教授

中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室

孙文兵 教授

首都医科大学附属北京朝阳医院肝胆外科西区

王道荣 主任医师

江苏省苏北人民医院胃肠外科

王正康 教授

中日友好医院普外科

徐列明 教授

上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

许剑民 教授

上海市复旦大学附属中山医院普外科

颜宏利 教授,

中国人民解放军第二军医大学医学遗传学教研室

杨薇 副教授

北京大学肿瘤医院超声科

袁建业 副研究员

上海中医药大学附属龙华医院/脾胃病研究所



百世登

**Baishideng**®

Published by **Baishideng Publishing Group Co., Limited**

Room 1701, 17/F, Henan Building,

No. 90 Jaffe Road, Wanchai, Hong Kong, China

Fax: +852-31158812

Telephone: +852-58042046

E-mail: [bpgoffice@wjgnet.com](mailto:bpgoffice@wjgnet.com)

<http://www.wjgnet.com>

