


# 学术展望

## Academic Perspective



Volume 14  
September 2018

美国华裔教授学者协会专刊



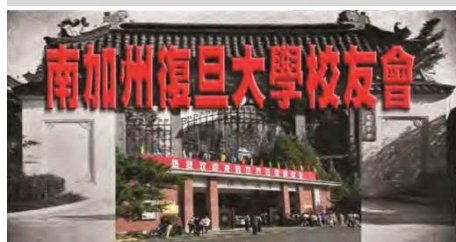
US Chinese Scholars Association

在贵刊发刊14周年暨美国华裔教授学者协会成立20周年之际，特此祝贺！复旦大学南加州校友会和南方医科大学北美校友会同贺



## 复旦大学南加州校友会简介

南加州复旦大学校友会早年原名为洛杉矶复旦校友会。2000年复旦大学与上海医科大学强强合并后，随着校友人数迅速扩充。2003年正式在加州政府登记注册，取名《南加州复旦校友会》，为非政治性非营利协会。目前南加州复旦校友会通讯网(FDAASC NET)联系的在南加州居住、工作和学习的复旦大学和原上医大校友约800位。为进一步加强校友之间交流，信息畅通，内容多元化，方便传递母校信息，建立“南加州复旦大学校友微信群”邀请校友加入，溶融一体共创未来。校友会成立宗旨和成员：(1)弘扬复旦精神“切问而近思，博学而笃志”，凝聚校友情感，增进校友之间联谊，加强与母校交流。(2)赞成本会宗旨，在复旦大学、预科、附中毕业或任职人士均欢迎参加本校友会。(3)定期和不定期举办各类活动。(4)现任理事会负责会务，组织各项活动，推动与母校和其它协会联系、合作与交流。近年来，校友会推荐和协助多位资深校友和社会名人为复旦大学的科研、教育和文化发展作傲人成绩和可观捐赠。校友会联系方式：郇永刚 626-872-7618, ygli@usc.edu



## 南方医科大学北美校友会 (Alumni Association of Southern Medical University-North America since 2011)



<http://www.aasmu108.com/>

[shhuang18@hotmail.com](mailto:shhuang18@hotmail.com)

南方医科大学(原第一军医大学)北美校友会(AASMU-NA)值母校六十华诞之际在美国洛杉矶成立。本校友会旨在为在北美的南方医科大学校友提供联谊、沟通的平台，同时为世界各地的南方医科大学校友提供相互交流的机会。秉承博学笃行、尚德济世的校训和敢为人先、开拓创新的精神，为母校的发展，为祖国繁荣富强贡献力量。

心系母校  
共创未来

# **Academic Perspective**

**USA Chinese Scholars Association**

**Volume 14, 2018**

ISBN 1936 -1246

## **Editor-in-Chief**

Dr. Sheng-He Huang, University of Southern California

## **Editorial Board**

Dr. Keqin Hu, University of California at Irvine

Dr. Michael Zhang, The Law Offices of Michael J. Zhang

Dr. Yong-Gang Li, University of Southern California

Dr. Bo Li, California State University, Los Angeles

Dr. Peter Zhang, ZHTECH Corporation

Ms. Penny Li, Mt. Sierra College

**© Copyrights of CSA 2018**

The contributors have the copyright and sole responsibility to their individual writings.

The papers reflect the authors' views only.





# 美国华裔教授学者协会2018年会暨20周年 庆祝大会

主题：回顾过去，展望未来

日期：2018年10月14日（星期天）

地点：SHERATON, SAN GABRIEL, 303 E. Valley Blvd San Gabriel, CA 91776

大会议程：

1:00 PM - 5:00 PM 学术研讨会

(A) 社会科学与人文; (B) 自然科学与工程; (C) 春晖计划报告会

6:30PM – 9:00 PM 晚宴

(A) 会长致词; (B) 贵宾讲话; (C) 主旨演讲

诚邀您的光临!



详情请访问[USACSA.ORG](http://USACSA.ORG)



# Table of Contents

慢性心力衰竭中FFA代谢变化及研究进展 杨少杰.....	1
两种方法治疗浸润性膀胱癌的近期临床效果及远期生存率比较 赵铁, 彭亮, 王春晖.....	8
细菌多聚磷酸盐在极端压力和耐药中的调控作用研究进展 区静怡, 彭亮.....	13
Effect of Competing Failure Mechanisms on The Fracture Toughness of AZ31 Mg Alloys Yan Li.....	25
Persistence of Circulating Hepatitis C Virus Antigens Specific Immune Complexes Ke-Qin Hu , Wei Cui.....	36
鼠李糖乳杆菌培养上清液通过抑制NF- $\kappa$ B通路预防大肠杆菌性脑膜炎的体外研究 曾庆, 曹虹.....	48
我和辛亥革命的緣份 李锐.....	64
介紹《愛的哲學》 李锐.....	72
中国文化在产品营销价值塑造方面的实践与探索 王慧琴.....	77
波形蛋白对EV71感染小鼠脑组织NLRP3炎性小体活化的影响 肖汉森, 曹虹.....	92
DIGITAL DIVIDES AND SOCIO-DEMOGRAPHIC FACTORS: A LONGITUDINAL QUANTITATIVE STUDY OF INTERNET USERS IN U.S. FROM 2000 TO 2010 Peter H. Zhang.....	103





# 慢性心力衰竭中FFA代谢变化及研究进展

杨少杰

**摘要：**心肌细胞通过对营养物质如葡萄糖、游离脂肪酸（FFA）、氨基酸等（主要是FFA）持续摄取与利用，从而不断合成腺苷三磷酸（ATP），为机体供能，完成正常的心脏泵血功能。慢性心力衰竭的发生伴随有能量代谢重构，能量代谢的改变也会影响慢性心力衰竭的进程。心肌代谢重构的多个环节是目前研究热点，且有可能成为潜在的心衰治疗靶点。FFA作为心肌细胞主要的能量利用底物，与慢性心力衰竭的关系值得重视，本文主要从慢性心力衰竭与血清中FFA代谢变化的相关研究进展作一综述。

**关键词：**慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)，游离脂肪酸(Free Fat Acid, FFA)，相关性，临床价值

## 1、慢性心力衰竭

### 1.1流行病学现状

随着社会老龄化，城镇化速度加快，各种不健康的生活方式盛行，总体上看，我国心血管疾病发生率与死亡率逐年攀升。近日发表的中国心血管报告（2017）显示<sup>[1]</sup>，我国心血管病(CVD)现患人数 2.9 亿，其中心力衰竭 450 万。CVD 死亡是居民疾病死亡的首要原因，构成 40% 以上，高于肿瘤及其他疾病。中国心力衰竭患者注册登记研究（China-HF）对 2012~2014 年 88 家医院 8 516 例心力衰竭患者的分析结果显示，住院心力衰竭患者病死率为 5.3%<sup>[2]</sup>。近年来，心力衰竭，尤其是慢性心力衰竭（CHF）发病率逐年增加，中国面临日渐加重的CHF负担。由于其发病率高、预后差、病死率高，已成为全球重大卫生问题，是21世纪心血管领域的两大挑战之一。尽管在医学和外科管理方面取得了不少进展，但CHF死亡率依然很高<sup>[3-5]</sup>，仍面临严峻挑战。这强调了改善一级预防CHF的必要性，防治CHF刻不容缓。

### 1.2病因及危险因素

慢性心力衰竭（CHF）是由于心脏结构性或功能性疾病引起心功能下降所导致的一种临床综合征，是心血管疾病的终末期表现和最主要死因。主要表现为呼吸困难、体力活动受限和体液潴留。一般均有代偿性心脏扩大或肥厚及其他代偿机制的参与。另外，CHF时引发的收缩或舒张功能不全的原因还包括兴奋-收缩耦联功能失常、胚胎基因表达、钙应用蛋白改变和心肌细胞死亡等。

中国心力衰竭患者注册登记研究（China-HF），结合中国统计年鉴，根据地域、经济状况对全国具有代表性的88家医院所提供的8516例心衰患者数据进行分析，发现心衰患者中冠

心病占 49.4% (4207/8 516)、高血压占 54.6% (4 649/8 516) [2]。导致CHF患者死亡的主要病种变化趋于一致,我国和欧美国家均以冠心病和/或高血压为主[6]。其次,感染、劳累或应激反应及心肌缺血是引起心衰加重的主要诱因。

## 2、游离脂肪酸 (FFA)

FFA是指血清中未与甘油、胆固醇等酯化的脂肪酸,主要是长链脂肪酸,又称非酯化脂肪酸(non-esterified fatty acid, NEFA)。正常情况下,血清中含量极少。FFA是血液中能直接参与代谢的脂质,是脂肪代谢的枢纽。FFA的 $\beta$ 氧化能够产生更多的能量,因此增加的FFA可节约葡萄糖,使其以糖原形式储存,在长时间缺乏能量摄入状态下防止蛋白质分解。有研究显示,FFA比甘油三酯和血清总胆固醇更能敏感反应机体的脂肪代谢变化[7]。

体外实验证实,不同种类及不同浓度的FFAs对细胞的损伤及保护作用各异,如饱和脂肪酸(SFAs)及不饱和脂肪酸(uFAs)可引起多种细胞凋亡,低浓度的花生四烯酸(AA)(5-10 $\mu$ mol/L)对细胞有保护作用,而高浓度的AA(20 $\mu$ mol/L)可引起细胞凋亡[8-10]。

目前不少学者提出,FFA引起细胞凋亡,可能与肿瘤坏死因子(NTF-a)诱导的致细胞凋亡的蛋白过度表达、内皮细胞一氧化氮合酶(NOs)活性改变和细胞因子刺激内皮细胞神经酰胺的产生有关[11]。系列研究发现糖尿病、心血管疾病等众多疾病与FFA的浓度变化有密切关系,其含量的异常变化是病情发展的重要依据。同时FFA也参与细胞增殖、炎症反应、激素调控等,是一种具有多种生理功能的信号分子。

## 3.慢性心力衰竭代谢重构与FFA相关研究

CHF的病理生理学机制有水液潴留、血流动力学异常、神经内分泌异常等。目前,心肌代谢重构是CHF病理生理学机制热点。

### 3.1心肌的正常能量代谢

心肌能量代谢过程主要包括 3个过程(见图1):①是营养物质(FFA、葡萄糖、氨基酸等)的摄取与利用,其中FFA是主要的能源利用底物。在生理条件下,FFA可提供心肌代谢所需的60%至70%的三磷酸腺苷。②是氧化磷酸化过程。能源物质经TCA循环,产生的H<sup>+</sup>和FADH<sub>2</sub>经线粒体氧化呼吸链产生能量。③是ATP的转运和利用。上述任何过程发生障碍均可引起心肌能量代谢障碍。

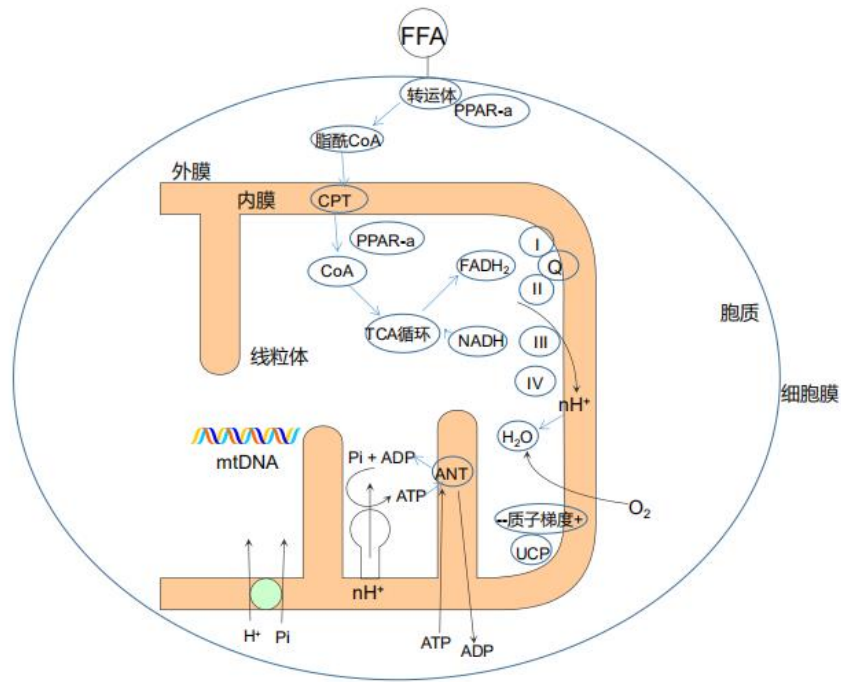


图1心肌细胞FFA代谢机制图

### 3.2慢性心力衰竭心肌的能量代谢改变

CHF过程中往往伴随着心肌基底物利用和能量代谢的改变，主要包括高能磷酸盐含量的减少，线粒体功能紊乱及葡萄糖利用的增加，而这些变化反过来进一步促进心肌重构和CHF的病程进展<sup>[12, 13]</sup>。由于心肌更偏向于利用脂肪酸作为能量底物，而相比于通过葡萄糖氧化产能，FFAs的 $\beta$ -氧化需要更多的氧。因此当体内FFA浓度升高时，心肌FFA摄取增加，耗氧量增加，在缺血缺氧条件下可以增加对心肌的缺血性损伤。其次，心衰时，心肌细胞 $\beta$ 3肾上腺素受体表达大量上调，使调节脂肪酸氧化的过氧化物酶增殖激活受体 $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )降低，进而可下调肉碱脂酰转移酶I (CPT-1)的表达，导致脂肪酸氧化不全，产物堆积，增加心肌毒性，促进心肌细胞凋亡，加速心衰进展<sup>[14]</sup>。同时，心衰时细胞内增加的FFA会促进解偶联蛋白 (UCP)的合成，降低质子电化学梯度，使线粒体氧化解偶联，ATP合成减少；增多的UCP会增加活性氧 (ROS)产生，过多蓄积的ROS会造成线粒体结构和功能的损伤，引起心肌细胞凋亡，由此导致线粒体氧化呼吸链的功能障碍，增加ROS的产生，从而形成恶性循环<sup>[15]</sup>。

### 3.3 FFA与慢性心力衰竭相关研究进展

尽管血浆FFA浓度与脂毒性，细胞凋亡以及糖尿病和冠心病的风险有关，但尚不清楚健康成年人的血浆FFA水平是否与CHF事件明显相关。先前的数据表明血浆FFA及其组成可能

影响心肌功能。虽然没有关于FFAs与CHF风险之间关系的确切数据，但早期的研究报道FFAs与包括高血压，心房颤动，糖尿病和CHD在内的HF风险因素之间的相关性，从而为FFA与CHF关联的因果提供了支持。

FFAs可能通过高血压的发展增加CHF的风险。在一项横断面研究中<sup>[16]</sup>，343名非糖尿病受试者的血浆FFA浓度与收缩压呈正相关。如Sarafidis和Bakris所述<sup>[17]</sup>，FFAs可通过多种途径促进高血压的发展，途径包括 $\alpha$ -肾上腺素能刺激，内皮功能障碍，高度氧化应激和血管细胞生长的刺激。

FFAs也可能通过冠状动脉疾病的发展增加CHF的风险。然而，文献中关于FFA-CHD的数据是不一致的。研究表明，血浆FFAs与CHD呈正相关<sup>[16]</sup>。而在巴黎前瞻性研究中，传统危险因素调整后FFA浓度与冠心病死亡无关<sup>[18]</sup>。因为该研究中的多变量模型包括血压变量，可能是FFA和CHD之间潜在的介质，FFA是否是冠心病死亡的主要预测因子还不确定。

美国心血管研究中心在一项前瞻性的大型美国老年人队列研究中发现<sup>[19]</sup>，控制已知的HF风险因素（如房颤和脑利钠肽）后，有证据支持血浆FFAs和HF的发生之间存在正相关。实验中的FFA与HF的相关性并没有因HF（收缩期与舒张期）类型或先前冠心病的存在而不同。并且，性别、BMI、腰臀比和基础糖尿病并没有改变FFA和HF的关系。FFA水平与HF的其他危险因素（如房颤、糖尿病）有关。最后，FFA浓度也与炎症细胞因子有关，会增加HF风险。

Tuunanen H<sup>[20]</sup>等人认为，通过抑制FFA代谢来增强心肌葡萄糖代谢的代谢调质可改善心力衰竭患者的心脏功能。且衰竭心脏比健康心脏更依赖于可利用的FFA。发挥衰竭心脏的最佳功能，需要同时利用葡萄糖和脂肪酸氧化作用。现已经有应用阿昔莫司、乙克莫舍、哌克西林、曲美他嗪等药物通过调整FFA代谢,从而改善心衰细胞心肌能量代谢的尝试<sup>[21]</sup>。改善心肌能量代谢药物，如曲美他嗪（选择性抑制游离脂肪酸 $\beta$ -氧化过程）、左卡尼汀、辅酶Q10等已在其他疾病（如冠心病）中应用并证实有效，但治疗心衰的疗效仍未确定<sup>[22]</sup>。

有国内研究证实<sup>[23]</sup>，慢性充血性心力衰竭患者与健康对照组患者相比，血清FFA浓度明显增高，并且给予治疗后，心功能明显改善的同时，血清FFA水平也明显下降。FFA的检测有助于CHF的临床评估和预后评价。可见，FFA也可以作为CHF患者治疗后疗效观察的指标之一。魏红随等人<sup>[24]</sup>对118例CHF患者进行随访一年，发现死亡组的FFA显著高于存活组，表明FFA对预后结局具有预测价值。

2017 ACC/AHA/HFSA心力衰竭管理指南更新建议<sup>[25]</sup>，BNP或NT-proBNP的测定有助于判断CHF患者的预后或疾病的严重程度（I类推荐），入院后进行基线BNP和/或肌钙蛋白的

检测有助于急性失代偿性心力衰竭患者的预后评估（I类推荐）。但左心室肥厚、心动过速、心肌缺血、肺动脉栓塞、慢性阻塞性肺疾病（COPD）等缺氧状态、肾功能不全、肝硬化、感染、败血症、高龄等均可引起利钠肽升高，因此其特异性不高。

临床上FFA检测近年才逐渐开展，但目前在临床上仅作为一些疾病评估的风险因素。近年来，研究和临床应用发现FFA具有越来越重要的参考价值。FFA可能比甘油三酯和血清总胆固醇更能敏感反应机体的脂肪代谢变化，反应心肌细胞的能量代谢水平，但FFA水平体外受多种因素的影响，个体内变异相当大，需要规范检测方法。血清FFA在临床上易于以相对较低的成本测量。对FFA与CHF的机制进一步详细阐明，将便于在临床上推广，提高检测的价值。

#### 4、结语

以上均提示我们，纠正FFA代谢异常，对其的干预及研究将会是CHF及其危险因素治疗的新希望，有望成为心血管疾病及其危险因素治疗及预防的新靶点。目前关于FFA的代谢的研究仍然存在大量需要进一步开展的工作。在观察性研究设计的情况下，我们不能排除残余或未测量混杂可能部分或完全解释观察到的关联的可能性。并且需要大型临床试验研究以及更深入及长期的探索和实践来阐明，FFA异常的人群中代谢综合征发病率是否与FFA正常的人群发病率有明显差异，目前的研究结果是否对其他种族或年轻年龄组（如在65岁以上人群中测量的FFAs可能不一定与年轻人测量的FFAs类似）均具有普遍性，如何更好的干预FFA的代谢，以及其远期治疗效果如何。如果FFA与CHF的风险相关性及其联系机制在未来的研究中得到更多证实，血浆FFA可能将帮助识别有CHF风险的老年人，并促使临床医生进行更密切的监测，进行包括体重控制，适当的饮食和体力活动等预防措施，并为临床诊治与预后提供新思路。

#### 参考文献

- [1]陈伟伟,高润霖,刘力生,朱曼璐,王文,王拥军,吴兆苏,李惠君,顾东风,杨跃进,郑哲,蒋立新,胡盛寿.《中国心血管病报告2017》概要[J].中国循环杂志,2018,33(01):1-8.
- [2]张健,张宇辉,代表中国心力衰竭注册登记协作组.多中心、前瞻性中国心力衰竭注册登记研究——病因、临床特点和资料情况初步分析[J].中国循环杂志,2015,30(5):413-416.
- [3]Goldberg RJ, Spencer FA, Farmer C, Meyer TE, Pezzella S. Incidence and hospital death rates associated with heart failure: a community-wide perspective [J].The American journal of

medicine,2005,118(7):728-34.

[4]Goldberg RJ, Glatfelter K, Burbank-Schmidt E, Farmer C, Spencer FA, Meyer T. Trends in mortality attributed to heart failure in Worcester, Massachusetts, 1992 to 2001[J]. Am J Cardiol. 2005;95:1324–1328.

[5]Shahar E, Lee S, Kim J, Duval S, Barber C, Luepker RV. Hospitalized heart failure: rates and long-term mortality[J]. Card Fail. 2004;10:374–379.

[6]American Heart Association.2002 Heart and Stroke Statistical Updata [M] .Dallas: American Heart Association,2002:19.

[7]Rhee Y, Paik MJ, Kim KR, et al. Plasma free fatty acid level patterns according to cardiovascular risk status in postmenopausal women[J].Clin Chim Acta, 2008, 392(1/2): 11-16.

[8]Shimabukuro M,Zhou Y T,Levi M,etal.Fatty acids induced  $\beta$  cell apoptosis:Alink between obsity and diabetes[J].Med Sei,1998,95:2498-2505.

[9]Mu Y M, Yanase T,Nishi Y, et al. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells[J].Endocrinology,2001,142:3590-3597.

[10]Jean V, Jame T, Muari W , et al. Elevated nonesterified fatty acid concentrations in severe preeclampsia shift the iso-electric characteristics of plasma albumin [J].Clin EdnocrinolMetab,1997,82:3786-3792.

[11]詹晓蓉.游离脂肪酸对血管内皮细胞影响的研究进展[J].国外医学(内分泌学册),2003(04):266-268.

[12]倪晶宇,李澜,李敏,樊官伟.慢性心力衰竭与能量代谢重构关系的研究进展[J].中国临床药理学杂志,2017,33(05):474-477.

[13]季朝红,王智慧,秦智峰,张静.慢性心力衰竭心肌能量代谢重构的研究现状[J].中国循证心血管医学杂志,2017,9(08):1023-1024.

[14]孔一慧,高艳辉,李为民. B3肾上腺素受体在心力衰竭时能量代谢重构中作用[J]. 现代生物医学进展,2013,32:6399-400.

[15]Maack C,Bohm M. Targeting mitochondrial oxidative stress in heart failure throtling the afterburner[J]. Am Coll Cardiol,2011,58:83-6.

[16]Carlsson M, Wessman Y, Almgren P, Groop L. High levels of nonesterified fatty acids are associated with increased familial risk of cardiovascular disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20:1588–1594.

[17]Sarafidis PA, Bakris GL. Non-esterified fatty acids and blood pressure elevation: a mechanism for hypertension in subjects with obesity/insulin resistance? [J]. Hum Hypertens.

2007;21:12–19.

[18] Charles MA, Fontbonne A, Thibault N, Claude JR, Warnet JM, Rosselin G, Ducimetière P, Eschwège E. High plasma nonesterified fatty acids are predictive of cancer mortality but not of coronary heart disease mortality: results from the Paris Prospective Study [J]. *Am J Epidemiol*. 2001;153:292–298.

[19] Djousse L, Benkeser D, Arnold AL, et al. Plasma Free Fatty Acids and Risk of Heart Failure, The Cardiovascular Health Study [J]. *CIRCULATION-HEART FAILURE*, 2013, 6(5):964-969.

[20] Tuunanen H, Engblom E, Naum A, J. Knuuti, 孙凯. 游离脂肪酸的消耗可迅速降低心肌病性心力衰竭患者的心脏做功和效率 [J]. *世界核心医学期刊文摘(心脏病学分册)*, 2007(04):21-22.

[21] 于佳雪, 徐亚伟, 肖丹, 陈清勇, 毛春莉. 游离脂肪酸与心血管疾病 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(10):1979-1982.

[22] 黄峻. 中国心力衰竭流行病学特点和防治策略 [J]. *中华心脏与心律电子杂志*, 2015, 3(2):81-82.

[23] 顾军, 高春芳, 王爱华, 等. 血浆游离脂肪酸对慢性心衰的评价作用 [J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24 (3)

[24] 魏红随, 王刚, 刘兴芝. 慢性心力衰竭患者血浆TIMP-4、sES及FFA动态变化及预后判断 [J]. *心脑血管病防治*, 2017, 17(04):256-259.

[25] 许顶立, 白煜佳. 2017 ACC/AHA/HFSA 心力衰竭管理指南更新解读 [J]. *中国全科医学*, 2017, 20(29):3579-3583.



## 两种方法治疗浸润性膀胱癌的近期临床效果及远期生存率比较

赵铁<sup>1</sup>, 彭亮<sup>2△</sup>, 王春晖<sup>3</sup>

(1. 南华大学医学院病原生物学研究所, 湖南衡阳421000; 2. 广州医科大学附属第二医院;  
3. 惠州市中心人民医院)

**摘要:** 目的 观察保留膀胱的综合疗法及根治性膀胱切除术治疗浸润性膀胱癌的近期临床效果、远期生存率, 为临床膀胱癌的治疗提供依据。**方法** 对2007年10月~2010年10月采用局部肿瘤切除术+化疗(保留组)及根治性膀胱切除术(全切组)治疗的59例浸润性膀胱癌患者的临床资料进行回顾性分析, 比较两组近期临床效果、远期生存率, 采用Cox回归分析法分析预后影响因素。**结果** 两组均无围手术期死亡病例, 保留组出血量少于全切组, 手术时间、住院时间、留置导管时间及膀胱冲洗时间均短于全切组, 并发症发生率显著低于全切组( $P < 0.05$ ); 两组5年生存率无显著差异( $P > 0.05$ )。**结论** 与根治性膀胱切除术比较, 保留膀胱的综合疗法对浸润性膀胱癌的远期肿瘤学根治效果相似, 且具有患者创伤小、术后恢复快及生存质量高等优点, 值得临床借鉴。

关键词: 浸润性膀胱癌; 局部切除; 全切; 生存率

△通讯作者: E-mail: 156815438@qq.com

本文发表于《山东医药》2014年第54卷第31期

根治性膀胱切除术是浸润性膀胱癌的临床首选治疗方法, 但因其创伤大及术后生活方式的影响, 许多患者难以接受。随着经尿道膀胱肿瘤电切术(Transurethral Resection of Bladder Tumor, TURBT)、化疗和放疗技术的不断进步, 保留膀胱的综合治疗方法逐渐引起国内外学者的关注。2007年10月~2010年10月, 我们分别采用局部肿瘤切除术+化疗及根治性膀胱切除术治疗浸润性膀胱癌患者59例, 现回顾性分析两种术式的近期疗效和远期生存率。

### 1 资料与方法

1.1 临床资料 同期于我院行手术治疗的浸润性膀胱癌患者59例, 男36例, 女23例; 年龄35~69 (52±10.3) 岁。经B超、CT、MRI、胸片、静脉尿路造影和膀胱镜检查未见远处转移灶及淋巴结转移, 无肾盂积水; 单发肿瘤者38例, 多发肿瘤21例; 术后病理报告均为膀胱尿路上皮癌。59例均有根治性膀胱切除术的指征, 但其中32例因合并多种疾病(如严重心肺病

变、难以控制的糖尿病或已做直肠癌根治术)或对尿流改道存在严重心理障碍等,行保留膀胱的局部肿瘤切除术(保留组),余27例行膀胱全切术与淋巴扫除术(全切组),两组年龄、性别及病情等基线资料比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

1.2 治疗方法 两组均采用腰麻或连续硬膜外阻滞麻醉,其中全切组按常规方法行根治性膀胱切除术。保留组:①局部肿瘤切除手术:12例采用德国Wolf电切镜行TURBT,切除范围包括膀胱肿瘤的瘤体、蒂部和基底部,深度达浅肌层,最后电灼或电切肿瘤基底周围2 cm左右;25例行传统经腹局部膀胱切除术,切除范围包括肿瘤及其周围2~3 cm的全层正常组织。

②动脉化疗:术后经双侧股动脉插管达髂内动脉,予吡柔比星20 mg分两侧注入(用药前给静脉注射盐酸昂丹司琼8 mg);动脉化疗前后充分水化(静脉输液3 000 mL),应用保肝药物。③膀胱灌注化疗:术后24 h内置导尿管入膀胱,排空尿液后注入羟基喜树碱(每次10mg),药物在膀胱内保留30 min后经尿道排出,每周1次。1个月后复查膀胱镜活检阴性者改为1次/2周×8次、1次/月,活检阳性(或尿细胞学检查阳性)者行挽救性膀胱癌根治术。

1.3 观察指标 记录两组术中指标(手术时间、术中出血量、留置导管时间)及术后并发症、住院时间,随访观察5年生存率。用门诊、电话、信件、走访等方法进行术后定期随访,每个月复查1次尿脱落细胞(连续3 d),每3个月复查1次膀胱镜(活检原肿瘤电切创面,并在膀胱各壁随机活检3块组织),确认是否有复发、转移或者死亡。

1.4 统计学方法 应用SPSS13.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用成组 $t$ 检验;计数资料采用 $\chi^2$ 检验。以Kplan-Meier法计算5年生存率(OS),并采用Logrank检验比较;Cox回归分析法分析相关危险因素。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 术中指标及术后并发症、住院时间 两组均无围手术期死亡病例,保留组出血量少于全切组( $t=-10.774$ ),手术时间( $t=-49.152$ )、住院时间( $t=-7.1263$ )、留置导管时间( $t=-6.270$ )及膀胱冲洗时间( $t=-7.669$ )均短于全切组( $P$ 均 $<0.05$ ),详见表1。保留组术后发生并发症6例(18.75%),其中闭孔反射导致膀胱穿孔4例(2例留置尿管后愈合,2例转开放手术后愈合)、尿道狭窄2例;全切组术后发生并发症10例(37.04%),其中切口感染4例、尿道狭窄6例,保留组并发症发生率低于全切组, $P < 0.05$  ( $\chi^2=6.944$ )。

表1 两组术中指标及术后近期恢复情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	手术时间 (min)	出血量 (mL)	留置导管时间 (d)	膀胱冲洗时间 (d)	住院时间 (d)
保留组	42.67±7.02	96.33±24.69	2.24±0.353	1.22±0.16	7.33±0.36
全切组	293±70.25	920.33±50.12	4.58±0.65	1.94±0.21	16.33±3.53

2.2术后5年生存率及预后相关危险因素 保留组和全切组术后分别有9、6例失访，5年生存率分别为71.39%、75.86%， $P > 0.05$  ( $\chi^2 = 0.243$ )。Cox回归分析发现，预后与年龄、性别、手术方法和术后并发症无显著相关性( $P > 0.05$ )，见表2。

表2 预后相关危险因素的Cox回归分析

相关因素	B	SE	Wald	df	Sig	Exp(B)	95% CI
手术方法	0.122	0.297	0.170	1	0.680	1.130	0.632~2.021
年龄	-0.023	0.020	1.295	1	0.255	0.977	0.940~1.014
性别	-0.332	0.322	1.061	1	0.303	0.717	0.381~1.350
并发症	-0.388	0.312	1.542	1	0.214	0.687	0.368~1.251

### 3 讨论

膀胱癌生物学特性差别很大，手术方法主要是保留膀胱的开放切除手术或经尿道切除手术。尽管目前浸润性膀胱癌的治疗金标准为膀胱根治性切除术和双侧盆腔淋巴结清扫术，对于中晚期浸润性膀胱癌行局部肿瘤切除术+化疗效果的研究仍一直颇受关注。膀胱根治性切除术后需行尿流改道，患者手术创伤大，同时有尿失禁和勃起功能障碍等严重并发症，导致生活质量明显降低。故许多患者无法耐受或主观排斥。此外，由于膀胱癌有多中心性及多发性的特点，保留膀胱手术后的复发率一般为60%~70%，加之再次复发可能不在原来位置，大多数学者主张术后采用定期膀胱腔内灌注化疗，此法以简单、效佳成为预防肿瘤复发和抑制肿瘤向恶性发展的主要手段。

本研究显示，两组均无围手术期死亡病例，保留组出血量少于全切组，手术时间、住院

时间、留置导管时间及膀胱冲洗时间均短于全切组，并发症发生率显著低于全切组；两组5年生存率无显著差异。可能原因：TURBT或开腹局部膀胱肿瘤切除术均无须尿流改道，可保持患者较好的生活质量，且在随访中复发的病例可再次或多次接受保留膀胱手术；本研究对象均为膀胱尿路上皮癌患者，对化疗敏感（鳞癌和腺癌对化疗不敏感）；动脉介入化疗不良反应小（主要以胃肠道反应、骨髓抑制为主，肝肾毒性不多见），且多在停药后逐渐消失，患者耐受良好，均能完成治疗全过程。本研究Cox回归分析发现，预后与年龄、性别、手术方法和术后并发症无显著相关性。提示与根治性膀胱切除术比较，保留膀胱的综合疗法对浸润性膀胱癌的远期肿瘤学根治效果相似，且具有患者创伤小、术后恢复快及生存质量高等优点。因此，对于浸润性膀胱癌患者，应结合肿瘤病程及患者术前条件等选择术式。

#### 参考文献:

- [1]陈伟.经尿道钬激光膀胱肿瘤切除术与经尿道膀胱肿瘤电切术治疗表浅层膀胱癌的疗效和安全性:对比研究[J].中国全科医学, 2014, 17(2): 223-225.
- [2]雷普,卜小斌,高飞,等.经尿道钬激光膀胱肿瘤切除术和膀胱肿瘤电切术治疗表浅层膀胱癌的疗效比较[J].现代泌尿外科杂志, 2014, 19(2): 108-110.
- [3]杨保申,李中明.经尿道膀胱肿瘤切除术治疗60例膀胱癌的临床疗效观察[J].现代诊断与治疗, 2014, 25(3): 679-680.
- [4]谢学文.经尿道切除手术对膀胱肿瘤的应用效果分析[J].求医问药(下半月), 2012, 10(7): 647.
- [5]张融融,张唯力.非肌层浸润性膀胱癌第2次经尿道切除术的研究进展[J].重庆医学, 2012, 41(33): 3552-3554.
- [6]马忠华.早期膀胱灌注预防浅表膀胱癌经尿道电切术后复发的疗效观察[J].中国民族民间医药, 2013, 22(1): 61.
- [7]李涛,杨立,明星,等.浅表性膀胱癌经尿道术后早期灌注化疗临床预后的系统评估[J].循证医学, 2013, 13(3): 147-151.
- [8]赫志强.经尿道切除膀胱肿瘤治疗膀胱癌的疗效和安全性分析[J].中国医药科学, 2013, 3(13): 25-27.
- [9]王有志,孙斌,罗光辉,等.经尿道膀胱肿瘤电切术与膀胱部分切除术治疗浅表性膀胱癌[J].新乡医学院学报, 2013, 30(12): 975-980.

- [10]陈学建, 夏振和, 陈茂章, 等. 四种化疗药物膀胱灌注预防浅表性膀胱癌经尿道膀胱肿瘤切除术后复发的成本—效果研究[J]. 中国全科医学, 2012, 15(19): 2188-2190.
- [11]林国太, 李昌桂, 张益明, 等. 浅表性膀胱癌经尿道电切术后复发的原因及预防策略[J]. 第三军医大学学报, 2012, 24(18): 1884-1887.
- [12]Solsona E, Climent MA, Iborra I, *et al.* Bladder preservation in selected patients with muscle-invasive bladder cancer by complete transurethral resection of the bladder plus systemic chemotherapy: long-term follow-up of a phase 2 nonrandomized comparative trial with radical cystectomy[J]. *European Urol*, 2009, 55(4): 911-919.

## 细菌多聚磷酸盐在极端压力和耐药中的调控作用研究进展

区静怡<sup>1</sup>, 彭亮<sup>2△</sup>

1. 广州市第八人民医院检验科, 广东 广州, 510000; 2. 广州医科大学附属第五医院检验科, 广东 广州, 510700

**【摘要】**多聚磷酸盐 (Poly-phosphate, Poly P) 是由几十个到几百个无机磷酸盐单体通过高能磷酸键聚合而成的线性多聚体, 是在细胞中用来储存磷及能量的多聚体形式, 无论在低等生物还是在高等生物细胞中都广泛存在<sup>[1]</sup>。尤其在微生物中, 多聚磷酸盐具有能量代谢、环境压力适应能力、生物膜形成、细菌毒力等生物学功能<sup>[2]</sup>。还有多项研究表明, 多聚磷酸盐与细菌的耐药性有关。目前的研究发现, 在微生物中有多种酶参与Poly P的代谢, 如多聚磷酸盐激酶 (poly phosphate kinase, PPK)、polyP-AMP-磷酸转移酶 (polyphosphate-AMP-phosphotransferase, PAP)、外切多磷酸酯酶 (Exo-poly phosphatase ,PPX)、内切磷酸酯酶 (Endo-poly phosphatase ,PPN) 等。其中PPK1是Poly P合成重要的酶, 并且参与多种胞内生化反应<sup>[3]</sup>。到目前为止, 在高等真核生物中未发现PPK1及其同工酶, 所以*ppk1*基因可以作为化学治疗的一个新靶点。本文将围绕多聚磷酸盐在细菌中抵抗环境压力和药物敏感性中的介导作用进行总结。

**关键词:** 多聚磷酸盐; 多聚磷酸盐激酶1; 大肠埃希菌; 药物敏感性

△通讯作者: 156815438@qq.com

**本文发表于区静怡2018年广州医科大学硕士论文综述部分**

多聚磷酸盐是丰富能量的来源, 它是高能磷酸键将几十个到几百个无机磷酸盐单体聚合形成的线性多聚体。由于火山口和深海蒸汽喷发口存在Poly P, Poly P可能是磷酸盐通过高温脱水产生, 广泛存在于地球初期。又因为Poly P能够作为生物体的能源, 磷酸化并活化乙醇、糖、核苷和蛋白质, 因此推测它在生命的起源中具有一定作用。一个世纪之前人们在观察到异染粒时发现了Poly P, 随后发现Poly P普遍存在于细胞中。细胞内Poly P代谢酶以及对对应基因的鉴定结果提示细胞具有自身代谢Poly P的酶, 保证细胞内Poly P维持在相对稳定的水平。

无论是细菌、真菌等低等单细胞生物, 还是高等动物, Poly P几乎存在于自然界的每一个细胞之中, 而且含量丰富。如此普遍存在的物质却一直被人们所忽视, 然而目前有限的研究中, Poly P却发挥了不可忽视的作用。细胞内的Poly P可感应各种代谢和环境信号。Poly P广

泛存在和作用表明其在生物进化和生理功能上具有不可忽视的作用。有研究表明，Poly P与细菌运动、生物膜形成、群体效应和孢子生成等有关，而且还能通过调节基因的表达从而帮助细菌抵抗环境胁迫压力。近年来，不少研究开始关注Poly P与细菌抗压力能力及药物敏感性的相关性。本文综述Poly P在细菌抗压力能力和药物敏感性中的调节机制的研究进展，希望能帮助研究Poly P在细菌生理过程代谢中的机制提供参考。

### （一）多聚磷酸盐及其代谢酶

多聚磷酸盐是指由高能磷酸酐键将数十个至数百个磷酸盐残基连接起来的线性聚合物<sup>[4]</sup>。（图1）在生命起源以前的进化史中，分布普遍及丰富的Poly P可以为多大分子化合物的定位或者组装提供多阴离子和具有高能量支架结构的不同长度的聚合物，Poly P既可以磷酸化并活化乙醇、糖、核酸和蛋白质，还可以与活化的烷基和氨基酸反应生成脂肪酸和多肽。在真核生物中，Poly P存在于亚细胞结构或者细胞器和真菌液泡中，能够占细胞干重20%<sup>[5]</sup>。研究表明Poly P可以帮助微生物适应极端的环境，例如含盐度、渗透压、干燥、紫外线辐射，温度压力和酸碱度的变化<sup>[6, 7]</sup>。

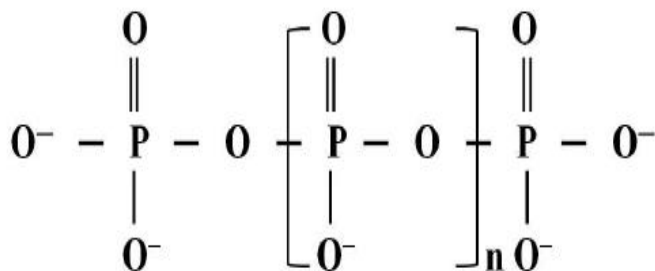


图1. Poly P的结构示意图

研究发现细胞具有自身代谢Poly P的酶从而维持胞内Poly P的稳定水平。多聚磷酸盐激酶（polyphosphate kinases, PPKs）是Poly P最重要的代谢酶之一，到目前为止已被证实的有PPK1、PPK2和PPK3三种。PPK1可以催化可逆反应使ATP末端磷酸化从而合成长链的多聚磷酸盐，PPK2则是催化可逆反应使GTP合成GDP<sup>[8]</sup>，PPK3利用Poly P作为CDP转化为CTP的供体<sup>[9]</sup>。PPK1是Kornberg<sup>[10]</sup>等人首次在大肠埃希菌中发现的，Zhu等人对大肠埃希菌的全长度PPK1晶体结构进行研究，发现PPK1是由连接的二聚体构成，具有四个结构域，活性位点位于高度保守的结构通道中，通道中含有特异性的ATP结合口袋，为移位的polyP提供容纳的场所<sup>[11]</sup>。PPK1在100多种细菌中存在同源序列，其中大部分都是致病菌<sup>[12]</sup>，过去有许多研究者通过将致病菌中编码PPK的*ppk*基因敲除来研究polyP和PPK对细菌生存和致病的影响。在Rashid<sup>[13]</sup>等人的研究中，多聚磷酸盐激酶对铜绿假单胞菌生物膜的形成、群体感应和毒力



非常重要。奇异变形杆菌*ppk*基因缺失株的生物膜形成能力及抵抗压力能力明显比野生株减弱<sup>[14]</sup>，PPK1在空肠弯曲杆菌适应环境压力及抗菌药物敏感性等方面发挥重要作用<sup>[15]</sup>，而*ppk1*基因在大肠埃希菌尿路感染中起调节作用<sup>[16, 17]</sup>。PPK1在病原菌抵抗各种抗生素中也起着关键作用，缺失了*ppk1*基因的铜绿假单胞菌对各种抗生素的抵抗力都下降了<sup>[18]</sup>，在Fraley<sup>[19]</sup>等报道的铜绿假单胞菌*ppk1*基因敲除株PAOM5对 $\beta$ -内酰胺类抗生素尤其敏感，而Kim<sup>[20]</sup>等发现伤寒沙门氏菌缺失了*ppk1*基因后，对多粘菌素的敏感性明显增加。PPK1及其同源物在高等真核生物细胞内并未被发现，并且各种研究结果显示PPK1在致病菌代谢和毒性发挥着关键的作用，所以PPK1可以作为潜在的药物靶点设计新的抑菌药物。

## （二）Poly P在细菌抵抗环境压力中的调节作用

### （1）Poly P感应对环境轻微变化并作出反应

细菌能够通过感应环境中的变化比如温度，酸碱度，渗透压等而作出调整，从而适应环境的压力。所需要的细胞膜通道是由聚抢基丁酸酯、钙离子和Poly P组成，并且具有离子选择性。

群体感应（quorum sensing, QS）是微生物群体在生长的过程中，由于群体密度的增加达到阈值时，信号分子的浓度也达到一定的水平，通过包括受体蛋白在内相关蛋白的信号传递，诱导或抑制信号最终传递到胞内，影响特定基因的表达，调控微生物群体的生理特征，如生物发光、抗生素合成、生物膜形成。群体感应系统调控微生物的多种细胞进程，如致病基因表达、毒素产生和胞外多糖合成，并在药物外排泵及微生物生物被膜的形成过程中发挥重要的调控作用。目前已知的群体感应信号包括酰基高丝氨酸内酯（N-Acyl homoserine lactones,AHLs）、寡肽（Oligopeptide）类分子、羟基棕榈酸甲基酯（Palmitic acid methyl ester,PAME）、呋喃硼酸二酯（Furanosyl borate diester,AI-2）和扩散性信号分子(Diffusible signal factor,DSF),其中大部分涉及细菌毒力的调节。

群体感应系统通过调控生物被膜的形成和直接参与药物外排泵的调控，在细菌耐药性机制的形成中发挥了重要作用。在Rashid的研究中，*ppk*基因的缺失使铜绿假单胞菌群体感应发生缺陷从而影响生物膜的形成和毒力基因的表达。

### （2）Poly P参与生物膜的形成

生物膜是细菌粘附于表面时，分泌的多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等将其自身包绕其中而形成的含有大量细菌的膜样复合体。生物膜形成经历三个阶段：首先，自由运动的细菌附着到固着点，通过鞭毛和纤毛永久性地吸附到介质表面；然后，分泌的细菌表面多糖稳定

生物膜结构，细胞间的信号传导调节生物膜的三维结构。PPK和鞭毛参与生物膜形成的第一、二阶段，而只有PPK参与第三阶段。有研究表明在铜绿假单胞菌中，藻酸盐是生物膜形成的重要因子。藻酸盐的合成，需要Poly P,GTP和ppGpp的共同调控，而该调控反应的调节子是AlgR2蛋白。*ppk1*基因敲除株胞外聚合物合成不足，从而导致对宿主的防御攻击更加敏感。

### (3) Poly P参与对物理和化学因子所致的压力反应

#### a.参与SOS应答系统（SOS response system,SOSr）：

当一些诱导因子如紫外线、活性氧簇、抗菌药物（如氟喹诺酮类抗菌药物、 $\beta$ -内酰胺类药物、利福平等）<sup>[21-23]</sup>等引起细菌DNA不可修复损伤，并形成一定量非正常的单链DNA（ssDNA）时,就会产生遗传毒性报警信号诱导SOS应答的发生，这是大部分细菌面对DNA损伤时普遍存在的调控网络。目前在大肠埃希菌SOSr已经确定的基因有40多个<sup>[24]</sup>，其中包括参与基因重组的*recA*和*lexA*，参与DNA损伤修复的*uvrA*和*ruvAB*，参与基因突变的*umuDC*、*polB*和*dinB*，还有表达调控、细胞分裂的*sulA*和*sfhA*<sup>[25]</sup>。Poly P参与SOS应答系统基因的表达。Shiba<sup>[26]</sup>等研究发现当细胞内外切多磷酸酯酶过度表达时会引起*rpoS*基因表达下降，这将使其依赖的*katE*基因表达也紧随下降，因此*katE*编码的HPII产量减少。Tsutsumi<sup>[27]</sup>等人发现polyP能够调控SOS效应基因的表达，尤其是*recA*基因，它可以编码具有DNA依赖性的ATP酶且主要参与DNA的修复。所以当polyP缺乏会导致SOS效应基因表达下调，并且DNA对丝裂霉素C或者紫外线表现更高的敏感性。

#### b.参与应激反应（Stringent response）：

应激反应是细菌抵御不良环境和营养胁迫时的一种保护机制。应激反应导致两种特殊核苷酸积聚：（1）ppGpp-四磷酸鸟苷；（2）pppGpp-五磷酸鸟苷。这些鸟苷是典型的小分子效应物，也被称为（p）ppGpp。（p）ppGpp对细胞生命活动的调控能产生多种作用效应，如感知细菌密度、抗生素合成、细胞分化、细菌毒素的产生以及病原菌的致病性等<sup>[28]</sup>。当环境中的磷酸盐、碳源或者氨基酸缺乏时，RelA会被诱导参与pppGpp和ppGpp的合成。相反，大量（p）ppGpp的产生会激活大量应激反应关键基因的表达，而这些核苷酸会通过作用于外切多磷酸酯酶抑制poly P的水解作用使poly P积聚<sup>[29]</sup>。

#### c.参与一般胁迫反应(General stress response,GSR)：

细菌在经历营养缺乏和环境压力胁迫时，还能通过一般胁迫反应来获得适应并生存。RpoS是一般胁迫反应的主要调控因子。RpoS是细菌RNA聚合酶的一种 $\sigma$ 亚基，当细菌进入静

止期或者经历高渗、低PH、高温、氧化损伤、饥饿等胁迫条件时，细胞内RpoS的合成就会增加，RNA聚合酶可以依靠RpoS识别启动子，促进胁迫条件下生存所必需基因的转录<sup>[30]</sup>，有研究表明RpoS可以直接或者间接调控大肠埃希菌约500个基因的表达<sup>[31]</sup>。大量环境和细胞内信号都参与了RpoS的调控，包括了控制rpoS转录的反式作用因子cAMP-CRP、正向调控因子ppGpp、GacS/GacA双组份系统等。Poly P也可以影响rpoS基因的转录，因为poly P既可以通过ppGpp正向调控rpoS转录的表达，也可以通过外切多磷酸酯酶间接刺激静止期rpoS基因的转录<sup>[26]</sup>。另外PPK可以通过负调控crp，在转录水平影响cAMP-CRP复合体的形成。cAMP-CRP复合体与rpoS基因启动子区域存在的CRP结合位点结合，调节rpoS转录<sup>[32]</sup>。RpoS参与病原菌对动物和原生动物的毒力作用<sup>[33, 34]</sup>，所以poly P在细菌毒力和对抗菌药物耐药性中发挥重要的作用。Rashid等发现铜绿假单胞菌ppk1基因缺失后对β-内酰胺类药物羧苄青霉素的敏感性较野生株明显增高<sup>[26]</sup>，同样大肠埃希菌PN033 ppk1基因缺失株对抗菌药物的敏感性增强<sup>[35]</sup>。

### （三）Poly P在细菌对药物抵抗中的调节作用

#### （1）调节外膜蛋白的表达

外膜蛋白（outer membrane protein, OMP）是存在于细菌细胞膜表面或者膜结构中的一种特殊的蛋白质，仅存在于革兰氏阴性菌中<sup>[36]</sup>，这也是革兰氏阴性菌的耐药性普遍比革兰氏阳性菌高的原因之一。近年来的研究表明，外膜蛋白通过改变细胞外膜的通透性和启动细菌主动药物转运系统而参与细菌耐药机制形成的。大肠埃希菌常见的外膜蛋白有OmpC、OmpF、OmpA、TolC等，这些外膜蛋白在空间结构和孔径大小各不相同，与抗生素也会有不同的相互作用。

有报道称，PPK可以通过调控外膜蛋白基因的表达来参与细菌耐药作用。cAMP能够正性调节ompF和ompC基因的表达<sup>[37]</sup>，但是Poly P可以抑制第三类腺苷酸环化酶的活性使cAMP生成减少<sup>[38]</sup>，因此可以推测Poly P的聚集可以使ompF和ompC基因表达水平下降。Chen发现大肠埃希菌在庆大霉素作用时Poly P可以调节外膜蛋白基因（抗生素流出基因和流入基因）的表达<sup>[39]</sup>。

#### （2）调节外排泵系统acrAB-tolC

细菌主动外排系统可以将药物选择性或者非选择性地排出细胞外，是细菌产生多重耐药性的一个重要机制，其中acrAB-tolC系统存在于多种细菌中。acrAB-tolC系统主要由三部分组成：周质融合蛋白（acrA）、外排转运蛋白（acrB）和外膜通道蛋白（tolC）。AcrAB-tolC

外排泵通过两种途径将药外排出细胞：一是与胞内的药物结合，结合后直接穿过细胞内外膜将药物运输至胞外，通过该途径排出胞外的药物有氯霉素和四环素；二是与周浆间隙中的药物结合，与tolC协同将药物运至细菌体外<sup>[40]</sup>。Chen的研究中大肠埃希菌*ppk1*缺失株对多种抗生素技术检测敏感性增高，并且通过RT-qPCR技术检测*ppk1*缺失株*acrA*基因发现表达水平明显下降<sup>[39]</sup>。

### （3）调节多重耐药（mar）操作子

*mar*操纵子广泛存在于肠杆菌科细菌的染色体上，是一个压力反应调控中心。*mar*基因含有两个转录单位（TU1和TU2），TU1可以编码MarC蛋白，TU2可以编码阻遏蛋白MarR、作用转录的正性调控蛋白MarA和操纵子的一小蛋白MarB。Mar表型的耐药特性主要是通过MarA调控*mar*操纵子内不同基因的表达而形成的<sup>[41]</sup>。MarA正性调节*mar*调节子上的*micF*基因，从而引起OmpF表达减少<sup>[42]</sup>，Mar株中的OmpC部分丢失，这使得细菌对抗生素的通透性下降。MarA除了调控外膜蛋白的表达，还可以正性调控药物外排泵AcrAB，使多种抗生素如氟喹诺酮、四环素、氯霉素、氨苄西林等外排增加<sup>[43, 44]</sup>。研究表明*marA*及*marB*基因在*ppk*基因缺失株的表达明显下调，尤其是*marA*基因，说明Poly P对*mar*操纵子的表达有影响<sup>[39]</sup>。

### （4）调节细菌生物被膜的形成

细菌生物被膜除了上述提到抵抗不良环境压力以外，也可以帮助细菌对抗药物产生耐药性。生物膜可以通过以下机制对抗抗菌药物：a.减少抗菌药物的渗透作用；b.吸附抗菌药物钝化酶，促进抗菌药物的水解；c.在生物被膜下的细菌代谢活动下降，因此对抗菌药物不敏感；d.生物被膜阻止了机体对细菌的免疫监视作用，产生免疫逃逸，机体免疫机制对细菌的杀伤作用就会减弱<sup>[45]</sup>。Poly P被认为是一种化学伴侣分子，可以稳定细胞质内蛋白质，也参与生物膜的形成，并且能保护生物膜在遇到抗生素时不被损伤。有研究发现，当大肠埃希菌*ppk*缺失株被抗生素刺激后，生物膜的形成受到阻碍，参与生物膜形成的基因如编码菌毛集群、鞭毛集群和生物膜形成调节子（BolA和McbR）的表达也下调<sup>[39]</sup>。

## （四）展望

目前，随着抗生素用量增多和不规范使用，临床上出现了大量的耐药菌株，许多常用的抗生素对细菌已无杀伤效果，因此寻求新的有效的抗菌药物是医学研究者面临的重大课题。已知Poly P在细菌适应极端压力和抵抗抗菌药物中发挥着重要的作用，而PPK/*ppk*可以作为一个很好的候选抗菌药物的作用靶点杀死或抑制病原菌，并且减少耐药性，为抗菌治疗提供新的思路。Saurav Saha<sup>[46]</sup>研究发现Dynemicin A与PPK的活性位点具有很强的亲和力，并且细胞

毒性较低，可以作为新的PPK靶点药物作进一步研究。对于研发PPK/*ppk* 靶点药物到临床实际应用还需要更多的实验去验证和探讨。

## 参考文献

- [1] Brown M R, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2004,101(46):16085-16087.
- [2] 张蕾丝, 王湘雨, 韩朋, 等. 大肠埃希菌PPK极端环境下调控作用研究进展[J]. 生物技术,2014(05):99-102.
- [3] 石廷玉, 王怀林, 谢建平. 多聚磷酸盐及其代谢酶的研究进展[J]. 生理科学进展,2011(03):181-187.
- [4] Kulaev I S. Biochemistry of inorganic polyphosphates[J]. Rev Physiol Biochem Pharmacol,1975,73:131-158.
- [5] Brown M R, Kornberg A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2004,101(46):16085-16087.
- [6] Rothschild L J, Mancinelli R L. Life in extreme environments[J].Nature,2001,409(6823):1092-1101.
- [7] Seufferheld M J, Alvarez H M, Farias M E. Role of polyphosphates in microbial adaptation to extreme environments[J]. Appl Environ Microbiol,2008,74(19):5867-5874.
- [8] Brown M R, Kornberg A. The long and short of it - polyphosphate, PPK and bacterial survival[J]. Trends Biochem Sci,2008,33(6):284-290.
- [9] Achbergerova L, Nahalka J. Polyphosphate--an ancient energy source and active metabolic regulator[J]. Microb Cell Fact,2011,10:63.
- [10] Kornberg A, Kornberg S R, Simms E S. Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*[J]. Biochim Biophys Acta,1956,20(1):215-227.
- [11] Zhu Y, Huang W, Lee S S, et al. Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis[J]. EMBO Rep,2005,6(7):681-687.
- [12] Rao N N, Gomez-Garcia M R, Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival[J]. Annu Rev Biochem,2009,78:605-647.

- [13] Rashid M H, Rumbaugh K, Passador L, et al. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2000,97(17):9636-9641.
- [14] Peng L, Jiang Q, Pan J, et al. Involvement of polyphosphate kinase in virulence and stress tolerance of uropathogenic *Proteus mirabilis*[J]. *Medical Microbiology and Immunology*,2016,205(2):97-109.
- [15] Gangaiah D, Kassem I I, Liu Z, et al. Importance of Polyphosphate Kinase 1 for *Campylobacter jejuni* Viable-but-Nonculturable Cell Formation, Natural Transformation, and Antimicrobial Resistance[J]. *Applied and Environmental Microbiology*,2009,75(24):7838-7849.
- [16] 罗苏, 彭亮, 潘嘉韵, 等. 尿路致病性大肠杆菌ppk1基因缺失株的构建及其生物学特性研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*,2013(7):531-536.
- [17] 潘嘉韵, 彭亮, 邓聪, 等. ppk1缺失对大肠埃希菌在小鼠膀胱定植及炎症诱导能力的影响[J]. *实用医学杂志*,2015(5):697-700.
- [18] Ortiz-Severín J, Varas M, Bravo-Toncio C, et al. Multiple antibiotic susceptibility of polyphosphate kinase mutants (ppk1 and ppk2) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as revealed by global phenotypic analysis[J]. *Biological Research*,2015,48(1):22.
- [19] Fraley C D, Rashid M H, Lee S S K, et al. A polyphosphate kinase 1 (ppk1) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2007,104(9):3526-3531.
- [20] Kim K, Rao N N, Fraley C D, et al. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp.[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2002,99(11):7675-7680.
- [21] Dorr T, Lewis K, Vulic M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*[J]. *PLoS Genet*,2009,5(12):e1000760.
- [22] Miller C, Thomsen L E, Gaggero C, et al. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality[J]. *Science*,2004,305(5690):1629-1631.
- [23] Bernier S P, Lebeaux D, Defrancesco A S, et al. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin[J]. *PLoS Genet*,2013,9(1):e1003144.



- [24] Courcelle J, Khodursky A, Peter B, et al. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*[J]. *Genetics*,2001,158(1):41-64.
- [25] 王进文, 白华, 颜世敢, 等. SOS应答系统及其对细菌耐药性和毒力的调控作用与在治疗细菌感染中的应用[J]. *中国抗生素杂志*,2014(10):795-800.
- [26] Shiba T, Tsutsumi K, Yano H, et al. Inorganic polyphosphate and the induction of rpoS expression[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1997,94(21):11210-11215.
- [27] Tsutsumi K, Munekata M, Shiba T. Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes[J]. *Biochim Biophys Acta*,2000,1493(1-2):73-81.
- [28] 刘彪, 宁德刚. 细菌应激反应中(p)ppGpp代谢的调控[J]. *微生物学通报*,2011(09):1425-1429.
- [29] Kuroda A, Murphy H, Cashel M, et al. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*[J]. *J Biol Chem*,1997,272(34):21240-21243.
- [30] Dong T, Schellhorn H E. Control of RpoS in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media[J]. *Mol Genet Genomics*,2009,281(1):19-33.
- [31] Patten C L, Kirchof M G, Schertzberg M R, et al. Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12[J]. *Mol Genet Genomics*,2004,272(5):580-591.
- [32] Cheng Y, Sun B. Polyphosphate kinase affects oxidative stress response by modulating cAMP receptor protein and rpoS expression in *Salmonella typhimurium*[J]. *J Microbiol Biotechnol*,2009,19(12):1527-1535.
- [33] Nickerson C A, Curtiss R R. Role of sigma factor RpoS in initial stages of *Salmonella typhimurium* infection[J]. *Infect Immun*,1997,65(5):1814-1823.
- [34] Hales L M, Shuman H A. The *Legionella pneumophila* rpoS gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*[J]. *J Bacteriol*,1999,181(16):4879-4889.
- [35] Chen J, Su L, Wang X, et al. Polyphosphate Kinase Mediates Antibiotic Tolerance in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* PCN033[J]. *Front Microbiol*,2016,7:724.
- [36] 张丽芳, 罗薇. 外膜蛋白的结构、功能及应用研究进展[J]. *中国畜牧兽医*,2014,41(10):55-61.
- [37] Dalhoff A. Transport of aminoglycosides in *Escherichia coli*[J]. *Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol*



Hyg A,1983,254(3):379-387.

[38] Guo Y L, Mayer H, Vollmer W, et al. Polyphosphates from *Mycobacterium bovis*--potent inhibitors of class III adenylate cyclases[J]. FEBS J,2009,276(4):1094-1103.

[39] Chen J, Su L, Wang X, et al. Polyphosphate Kinase Mediates Antibiotic Tolerance in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* PCN033[J]. Front Microbiol,2016,7:724.

[40] 徐婷, 金顺鑫, 王潇, 等. 细菌外排泵系统acrAB-tolC的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(09):92-95.

[41] Barbosa T M, Levy S B. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA[J]. J Bacteriol,2000,182(12):3467-3474.

[42] Cohen S P, Mcmurry L M, Levy S B. marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol,1988,170(12):5416-5422.

[43] Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants[J]. J Bacteriol,1996,178(1):306-308.

[44] Moken M C, Mcmurry L M, Levy S B. Selection of multiple-antibiotic-resistant (mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and acrAB loci[J]. Antimicrob Agents Chemother,1997,41(12):2770-2772.

[45] 尹秀玲, 牛发良. 大肠杆菌耐药机制的研究进展[J]. 河北北方学院学报(自然科学版),2007(01):49-53.

[46] Saha S B, Verma V. in Silico analysis of *Escherichia coli* polyphosphate kinase (PPK) as a novel antimicrobial drug target and its high throughput virtual screening against PubChem library[J]. Bioinformation,2013,9(10):518-523.



# 翡翠旅遊

JADE TOURS LIC.#2057956-40



**626-913-3136**

**FAX:626-913-2016**

E-mail:kathy.gorden@jadetours.net

17142 #D, COLIMA ROAD, HACIENDA HTS., CA 91745



電腦開票，迅速準確  
經驗豐富，代售旅遊保險  
團體另有優待  
代訂各地酒店、租車、機場接送  
專精中國大陸來美考察、旅遊、留學

## 豪華遊輪愛之船大特價

### 海上暢遊華人代理：

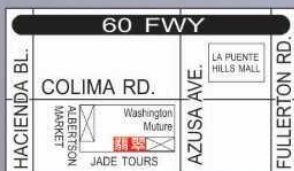
歐洲、北極、地中海、加勒比海、長江三峽、南極、南美、大溪地、馬爾代夫、斐濟、墨西哥、阿拉斯加、夏威夷、巴哈馬陽光之旅及東南亞世界各地豪華遊輪，有三天、五天、七天、十天等

### 旅遊

中國精華遊，台灣，香港，東南亞團，歐洲，中南美及世界各地旅遊。美西，美東，加拿大：洛磯山，溫哥華，維多利亞，西雅圖，黃石公園總統巨石，佛羅里達，芝加哥，夏威夷等

### 精選

大峽谷玻璃橋，聖地牙哥，海洋世界，迪士尼樂園，影城，洛杉磯市區觀光，太浩湖，三藩市優勝美地，拉斯維加斯，美南陽光，北極光遊等



美國國內外，環球機票，火車蜜月，公司旅遊，個人，家庭，校友，團體聚會 **代辦各國簽證**



# **Effect of Competing Failure Mechanisms on The Fracture Toughness of AZ31 Mg Alloys**

Yan Li

*Department of Mechanical and Aerospace Engineering*

*California State University, Long Beach, CA 90840, U.S.A*

## **Abstract**

The objective of this study is to develop a multiscale computational framework which evaluates the fracture toughness of Mg alloys by resolving different failure mechanisms. Design of high toughness Mg alloys with improved fracture toughness requires in-depth understanding of two levels of competitions: the competition between plastic deformation and crack formation as well as the competition between transgranular and intergranular fracture. A Cohesive Finite Element Method (CFEM) based model is developed to quantify the two levels of competition. The fracture surface energy for both transgranular fracture and intergranular fracture are evaluated through explicit simulation of crack propagation at the microstructure level. The conclusions indicated that microstructures with refined grain size and grain boundary bonding strength can best promote favorable failure mechanisms.

**Keywords: fracture toughness, cohesive finite element method, transgranular and intergranular fracture**

## **1. Introduction**

Transportation is the fastest growing major contributor to the global climate change, accounting for 23% of energy-related carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) emissions. There is strong demand from the transportation industry to reduce the weight of structural components in order to reduce both energy consumption and CO<sub>2</sub> emissions. Magnesium is the lightest known structural metal. Magnesium (Mg) alloys are approximately 35% lighter than aluminums and 80% lighter than most of the steels. In addition to light weight, Mg alloys also have many other attractive properties, such as excellent sound damping capabilities, hot formability, and excellent machinability. In order to use magnesium

alloys in structural applications, it is important to ensure that their mechanical properties satisfy both reliability and safety requirements. Fracture toughness is one of the most important mechanical properties considered in engineering applications. It has been reported that fracture toughness in magnesium alloys is lower than that in aluminum alloys[1-3].Improvement of fracture toughness of Mg alloys requires quantitative relations between failure/deformation mechanisms and fracture toughness to be established.

Fracture toughness of Mg alloys is a combined effect of both plastic energy dissipation and crack surface formation. Intergranular fracture usually leads to tortuous crack path by promoting crack propagation along grain boundaries. However, it discourages the energy dissipation through plastic deformation and does not always lead to high fracture toughness. Transgranular fracture, on the other hand, forms smaller areas of fracture surfaces but allows more significant plastic energy dissipation and more ductile response [4]. Therefore, the design of Mg alloys with improved fracture toughness requires in-depth understanding of the underlying physics of each failure mechanism, their competition and influence on the toughening of the entire material. In this paper, we primarily focus on two aspects of the design task: (1). the competition between material deformation and crack formation; (2). the competition between transgranular fracture and intergranular fracture.

A multiscale computational framework is developed to evaluate the fracture toughness of Mg alloys by quantify the competing mechanisms. This framework allows realistic representation of microstructure and account of microstructural level of deformation, damage and failure mechanisms.  $J$ -integral is employed to evaluate the fracture toughness by considering all the microscopic information. Cohesive Finite Element Method (CFEM) is employed to tract the crack propagation at the microstructure level. To explicitly resolve transgranular and intergranular fracture, cohesive surfaces are embedded everywhere along the edges of all the bulk elements in the microstructure region [5-8]. Constitutive relations for the bulk grains and cohesive surfaces within grains and along the grain boundaries are specified separately. Therefore, the energy dissipation rate in terms of

surface formation can be evaluated directly by measuring the corresponding crack length. The plastic energy dissipation rate can be obtained as the difference between the  $J$  value and the surface energy dissipation rate.

## **2. CFEM –based multiscale framework**

An edge-cracked specimen under Mode I tensile loading is modeled as shown in Fig.1. This proposed framework consists of two length scales. The microstructure region has a length of 0.5 mm, width of 0.25mm and a pre-crack length of 0.18 mm. The entire square specimen has a size length of 1.825 mm. A boundary velocity of  $v = 5$  mm/s is imposed at the top and bottom edge of the specimen to effect Mode I tensile loading. The remaining edges of the specimen are traction-free. Conditions of plane strain are assumed to prevail.

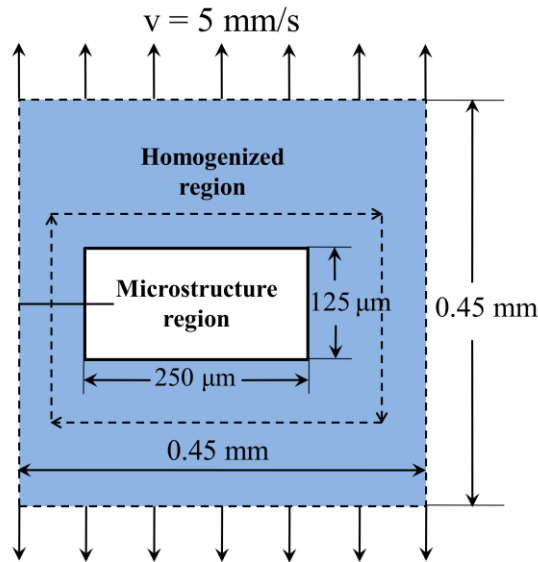


Fig.1 Specimen configuration under Mode-I loading.

Both cohesive elements along grain boundaries and within grains follow the bilinear traction-separation law. This law is derived from a potential  $\Phi$  which is a function of separation vector  $\Delta$  through a state variable defined as  $\lambda = \sqrt{(\Delta_n/\Delta_{nc})^2 + (\Delta_t/\Delta_{tc})^2}$ . This variable describes the effective instantaneous state of mixed-mode separations. Here,  $\Delta_n = \mathbf{n} \cdot \Delta$  and  $\Delta_t = \mathbf{t} \cdot \Delta$  denote, respectively, the normal and tangential components of  $\Delta$ , with  $\mathbf{n}$  and  $\mathbf{t}$  being unit normal and tangent

vectors.  $\Delta_{nc}$  is the critical normal separation at which the cohesive strength of an interface vanishes under conditions of pure normal deformation ( $\Delta_t = 0$ ). Similarly,  $\Delta_{tc}$  is the critical tangential separation at which the cohesive strength of an interface vanishes under conditions of pure shear deformation ( $\Delta_n = 0$ ).  $T_{\max}$  represents the maximum traction that the cohesive element can sustain at the onset of irreversible separation.

As illustrated by the dashed lines in Fig.1, the  $J$ -integral is calculated along an arbitrary contour within the homogenized region by following

$$J = \int_{\Gamma} \left[ \left( \int_0^t \boldsymbol{\sigma} : d\boldsymbol{\varepsilon} + \frac{1}{2} \rho \dot{\mathbf{u}} \cdot \dot{\mathbf{u}} \right) dx_2 - \mathbf{t} \cdot \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial x_1} ds \right] + \int_A \left( \rho \ddot{\mathbf{u}} \cdot \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial x_1} - \rho \dot{\mathbf{u}} \cdot \frac{\partial \dot{\mathbf{u}}}{\partial x_1} \right) dA, \quad (1)$$

where  $\mathbf{t}$  is the traction on a surface with normal  $\mathbf{N}$ ,  $\mathbf{u}$  is the displacement,  $\boldsymbol{\varepsilon}$  denotes the strain and  $\rho$  is the mass density.

As shown in Fig. 1, contours for  $J$  evaluation are solely within the homogenized part of the specimen where no cohesive elements are used. Due to the path-independent property of  $J$ -integral, the results extracted from different contours are very close to each other. To best eliminate the numerical error, the average value of  $J$  from four different contours is used in the remainder of this paper.

The  $J$  value calculated from Eqn.(1) includes contributions from both plastic dissipation and the energy spent in creating new surfaces. A typical crack path in AZ31 Mg alloy includes both transgranular and intergranular fracture as shown from the experimental work by Somekawa and Mukai [9]. The energy release rate  $J$  can be stated as

$$\begin{aligned} J &= \frac{\partial U_f}{\partial A} = J_s + J_p \approx \frac{(\Phi_G L_G + \Phi_{GB} L_{GB}) t_t}{W t_t} + \frac{\int_0^t \left( \int_V \boldsymbol{\sigma} : \dot{\boldsymbol{\varepsilon}}^{pl} dV \right) dt}{W t_t} \\ &= \frac{L}{W} \left( \Phi_G \frac{L_G}{L} + \Phi_{GB} \frac{L_{GB}}{L} \right) + \frac{\int_0^t \left( \int_V \boldsymbol{\sigma} : \dot{\boldsymbol{\varepsilon}}^{pl} dV \right) dt}{W t_t} \\ &= \xi \left( \frac{\mathbf{T}_{\max}^G}{\sigma_y}, \frac{\mathbf{T}_{\max}^{GB}}{\sigma_y} \right) \left( \Phi_G H_G + \Phi_{GB} H_{GB} \right) + \frac{\int_0^t \left( \int_V \boldsymbol{\sigma} : \dot{\boldsymbol{\varepsilon}}^{pl} dV \right) dt}{W t_t}, \end{aligned} \quad (2)$$

where  $J_p$  and  $J_s$  denote the energy release rate associated with plastic dissipation and surface formation, respectively.  $U_f$  is the total energy released over the projected crack length  $W$ .  $A = Wt_t$  is the total projected crack surface area with  $t_t$  being the specimen thickness. It should be noted that  $W$  is the projected crack length in the direction of crack propagation, while  $L$  is the total crack length. Specifically,  $L = L_G + L_{GB}$ , with  $L_G$  and  $L_{GB}$  representing the crack arc lengths within the grains and along the grain boundaries, respectively. Accordingly,  $H_G$  and  $H_{GB}$  are the proportions of crack lengths associated with transgranular and intergranular fracture, respectively. Both  $H_G$  and  $H_{GB}$  can be explicitly extracted from the CFEM simulations.  $\Phi_G$  and  $\Phi_{GB}$  are, respectively, the fracture energies within the grains and along the grain boundaries as defined in Eqn. **Error! Reference source not found.**  $\xi$  measures the ratios between the actual crack length  $L$  and the projected crack length  $W$ . It captures the influences of microstructural attributes on the crack tortuosity. Here,  $\xi$  is defined as the crack length multiplication factor (CLMF). As discussed in the following section,  $\xi$  primarily depends on the cohesive bonding strength within the grains ( $T_{\max}^G$ ), the cohesive bonding strength along the grain boundaries ( $T_{\max}^{GB}$ ), and the yield stress of grains  $\sigma_y$ .



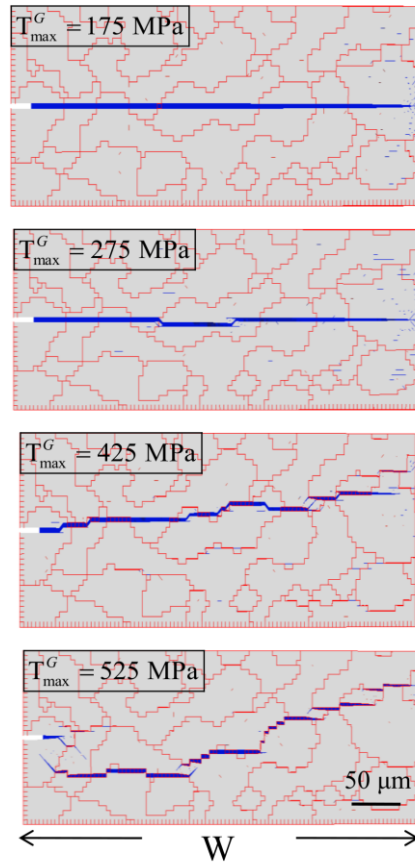


Fig. 2 Crack trajectories under different grain cohesive strength  $T_{\max}^G$ .

### **3. Results and discussion**

Two sets of calculations are conducted to systematically analyze the effect of cohesive strength of the grains/grain boundaries on the activation of failure mechanisms and their influence on the overall fracture toughness. A realistic AZ31 Mg microstructure is employed in the following studies.

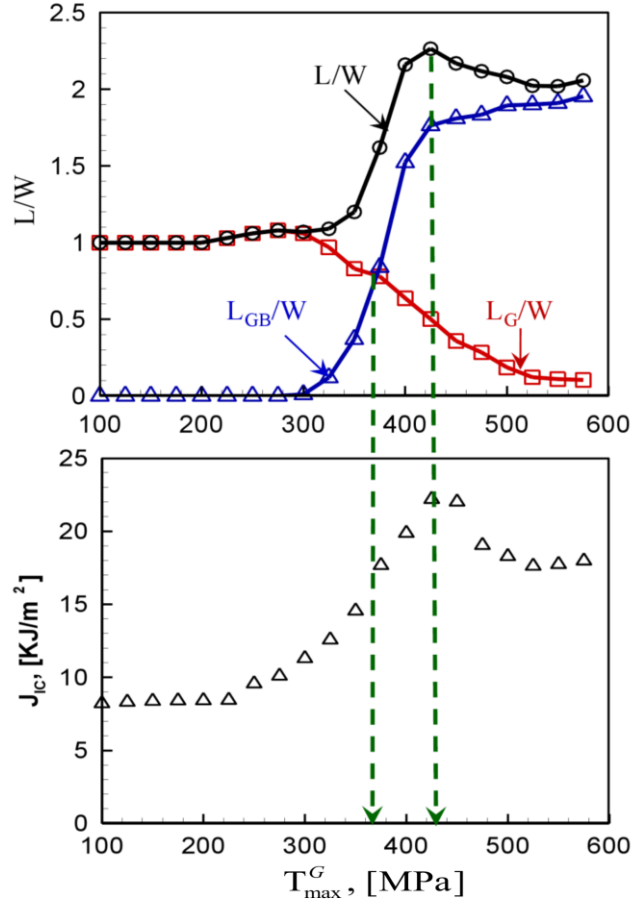


Fig. 3 Illustration of the competition between transgranular and intergranular fracture and its effect on fracture toughness.

#### 4.1. Effect of cohesive strength of grains

In this set of calculations, all grains have the same yield stress  $\sigma_y = 150$  MPa.  $\Phi_G = \Phi_{GB} = 7.5$  kJ/m<sup>2</sup> for both the grains and the grain boundaries. The maximum cohesive strength along the grain boundaries is  $T_{\max}^{GB} = 350$  MPa, and the cohesive strength in the grains  $T_{\max}^G$  is systematically varied from 100 MPa to 575 MPa with an interval of 25 MPa.

As shown in Fig. 2, transgranular fracture is the only failure mode observed when  $T_{\max}^G = 175$  MPa. As  $T_{\max}^G$  increases, the crack starts to propagate into the grain boundaries. Intergranular fracture gradually becomes the dominated failure mode.

The competition between transgranular fracture and intergranular fracture is quantified in Fig. 3.

Here,  $L_G/W$  and  $L_{GB}/W$  represent the proportions of transgranular fracture and intergranular fracture, respectively.  $L/W$ , which is the sum of  $L_G/W$  and  $L_{GB}/W$ , is defined as the crack length multiplication factor  $\xi$  as in eqn. **Error! Reference source not found.** As illustrated in Fig. 11,  $T_{\max}^G \approx 385$  MPa corresponds to the intersection of the curve for  $L_G/W$  and curve for  $L_{GB}/W$ . This point indicates the transition from transgranular fracture dominance to intergranular fracture dominance. Transgranular fracture is the dominant failure mode when  $T_{\max}^G < 385$  MPa as  $L_G/W$  is always above  $L_{GB}/W$ . The trend reverses when  $T_{\max}^G > 385$  MPa as intergranular fracture takes over and becomes the dominated failure mode. The maximum  $J_{IC}$  is reached at  $T_{\max}^G \approx 425$  MPa rather than at the transition point  $T_{\max}^G \approx 385$  MPa.

#### 4.2. Effect of cohesive strength of grain boundaries $T_{\max}^{GB}$

Conclusions from the above discussions indicate that  $T_{\max}^G = 425$  MPa can lead to the highest  $J_{IC}$  when  $T_{\max}^{GB}$  is fixed at 350 MPa. In this set of calculations,  $T_{\max}^{GB}$  is systematically varied from 100 MPa to 575 MPa with an interval of 25 MPa.  $T_{\max}^{GB}/T_{\max}^G$  considered here spans from 0.24 to 1.35.  $\sigma_y = 150$  MPa and  $\Phi_G = \Phi_{GB} = 7.5$  kJ/m<sup>2</sup> for both the grains and the grain boundaries.

According to Fig. 4, both  $T_{\max}^G$  and  $T_{\max}^{GB}/T_{\max}^G$  influence the activation of failure mechanisms and, consequently, alter the material fracture resistance. As shown in Fig. 4(a), the change of fracture from intergranular dominant mode to transgranular dominant mode is observed as  $T_{\max}^{GB}/T_{\max}^G$  increases. Specifically, the crack primarily grows along the grain boundaries when  $T_{\max}^{GB}/T_{\max}^G < 0.5$ . Crack surfaces are created with relatively low level of plastic dissipation. When  $0.5 < T_{\max}^{GB}/T_{\max}^G < 1$ , both transgranular and intergranular fracture are observed. Although grain boundaries still serve as the damage initiation sites, microcracks which are initiated along the grain boundaries tend to propagate into the neighboring grains, leading to more significant plastic

deformation. As shown in Fig. 4 (b),  $T_{\max}^{GB} / T_{\max}^G \approx 1$  corresponds to the transition from intergranular dominated mode to transgranular dominated mode. This indicates that the corresponding  $T_{\max}^{GB}$  is around 425 MPa, which is exactly the prescribed  $T_{\max}^G$ .  $T_{\max}^{GB} / T_{\max}^G > 1$  directs the crack to go through grains with a straighter crack trajectory. It is noted in Fig. 5 (b) that the highest  $J_{IC}$  value is achieved when  $L/W$  reaches its peak. The value of  $T_{\max}^{GB}$  which corresponds to both peaks is approximately 400 MPa. This trend is in consistency with the result as shown in Fig. 3.

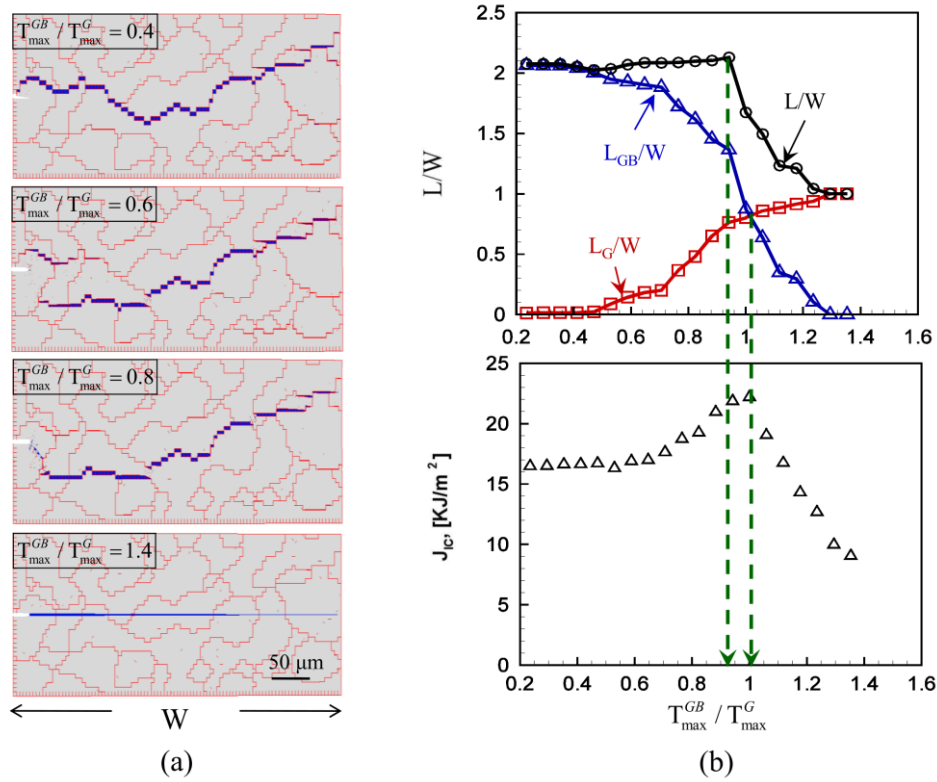


Fig. 4 Illustration of (a) crack trajectory under various  $T_{\max}^{GB} / T_{\max}^G$  when  $T_{\max}^G = 415$  MPa and (b) the effect of competing failure mechanisms on fracture toughness.

## 5. Summary

A Cohesive Finite Element Method (CFEM) based multiscale computational framework is

developed to evaluate the effects of competing fracture mechanisms in ductile polycrystalline microstructures. This framework allows the competition between material deformation and crack formation as well as the competition between transgranular fracture and intergranular fracture to be quantified by considering the effect of microstructural attributes and constituent behavior. The focus is on relating the microstructure to the macroscopic fracture toughness. The simplified material model tracks the properties of the AZ31 Mg alloy. The fracture toughness is predicted by calculating the  $J$ -integral. The semi-analytical model developed here allows energy dissipation in terms of bulk plastic deformation and crack surface formation to be separately analyzed. Results suggest that the best toughening effect is achieved with balanced transgranular and intergranular fracture. This requires refined grain size and balanced bonding strength in grains and grain boundaries.

## **References**

- [1] H. Somekawa and T. Mukai, "Fracture toughness in a rolled AZ31 magnesium alloy," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 417, pp. 209-213, 2006/06/29/ 2006.
- [2] J. G. Kaufman, R. L. Moore, and P. E. Schilling, "Fracture toughness of structural aluminum alloys," *Engineering Fracture Mechanics*, vol. 2, pp. 197-210, 1971/05/01/ 1971.
- [3] X. Guo, K. Chang, L. Q. Chen, and M. Zhou, "Determination of fracture toughness of AZ31 Mg alloy using the cohesive finite element method," *Engineering Fracture Mechanics*, vol. 96, pp. 401-415, 2012/12/01/ 2012.
- [4] G. M. Ludtka and D. E. Laughlin, "The Influence of Microstructure and Strength on the Fracture Mode and Toughness of 7xxx Series Aluminum-Alloys," *Metallurgical Transactions a-Physical Metallurgy and Materials Science*, vol. 13, pp. 411-425, 1982.
- [5] X. P. Xu and A. Needleman, "Numerical Simulations of Fast Crack-Growth in Brittle Solids," *J. Mech. Phys. Solids*, vol. 42, p. 1397, Sep 1994.

- [6] J. Zhai, V. Tomar, and M. Zhou, "Micromechanical Simulation of Dynamic Fracture Using the Cohesive Finite Element Method," *J. Eng. Mater. Technol.*, vol. 126, pp. 179-191, 2004.
- [7] X. P. Xu and A. Needleman, "Numerical simulations of dynamic interfacial crack growth allowing for crack growth away from the bond line," *Int. J. Fracture*, vol. 74, pp. 253-275, 1985.
- [8] A. Needleman, "An Analysis of Tensile Decohesion Along an Interface," *J. Mech. Phys. Solids*, vol. 38, pp. 289-324, 1990.
- [9] H. Somekawa and T. Mukai, "Fracture toughness in a rolled AZ31 magnesium alloy," *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 417, pp. 209-213, 2006.

# **Persistence of Circulating Hepatitis C Virus Antigens Specific Immune Complexes in Patients with Resolved HCV Infection**

Ke-Qin Hu, MD and Wei Cui, MD

Division of GI/Hepatology, University of California, Irvine, School of Medicine, Orange, CA

## **ABSTRACT**

**Background.**Our recent study indicated possible presence of detectable hepatitis C virus antigens (HCV-Ags) after denaturation of sera with resolved HCV (R-HCV) infection. The present study determined and characterized persistent HCV-Ags specific immune complexes (ICs) in these patients.

**Methods.**Sixty-eight sera with R-HCV and 34 with viremic HCV (V-HCV) infection were tested for free and IC-bound HCV-Ags using HCV-Ags enzyme immunoassay (EIA), the presence of HCV-Agspecific ICs by immunoprecipitation and Western blot (IP-WB), HCV-ICs containing HCV virions using IP and HCV RNA RT PCR, and correlation of HCV-ICs to clinical presentation in these patients.

**Results.**Using HCV-Ags EIA, we found 57.4% of sera with R-HCV infection were tested positive for bound, but not free HCV-Ags. Using pooled, or individual anti-HCV E1/E2, cAg, NS3, NS4b and/or NS5a to precipitate HCV-specific-Ags, we confirmed persistent HCV-Ags ICs specific to various HCV structural and non-structural proteins not only in V-HCV infection, but also R-HCV infection. Using IP and HCV RNA PCR, we then confirmed the presence of HCV virions within circulating ICs in V-HCV, but not R-HCV sera. Multivariable analysis indicated significant and independent associations of persistent circulating HCV-Ags specific ICs with both age and presence of cirrhosis in patients with R-HCV infection.

**Conclusions.**Various HCV-Ag specific ICs, but not virions, persist in 57.4% of patients who had spontaneous or treatment-induced HCV clearance for 6 months to 20 years. These findings enriched our knowledge on HCV pathogenesis, and support further study on its long-term clinical relevance, such as extrahepatic manifestation, transfusion medicine, and hepatocarcinogenesis.

**Key words** HCV: hepatitis C virus; HCV infection; HCV-Ags: hepatitis C virus antigens; HCVcAg: HCV core antigen; HCV ICs: HCV immune complexes

## **Introduction**

Hepatitis C virus (HCV) infection affects approximately 115 million people worldwide, that can cause chronic hepatitis C (CHC), cirrhosis, and be associated with development of hepatocellular carcinoma (HCC) (1-3). Direct acting antiviral HCV treatments are highly safe and effective, and have significantly increased the frequency of cures for HCV infections (4, 5). Studies have demonstrated sustained virologic response (SVR) is durable and associated with improved outcomes (6).

HCV replication includes cleavage of a large protein precursor to several HCV structural and non-structural (NS) proteins (7). Studies have demonstrated that HCV proteins may form immune complexes (ICs) with the corresponding antibodies produced by host immune response. These HCV-specific ICs could be detectable during viremic HCV infection (V-HCV) and possibly involved in the pathogenesis of HCV-related extrahepatic manifestations, such as glomerulonephritis, cryoglobulinemia, and response to IFN-based HCV treatment (8-14). Dissociation of HCV-core from ICs has also been reported to increase the sensitivity of HCVcAg test (15). However, most of these studies either tested ICs containing HCV virions, ICs containing HCV core or uncharacterized HCV ICs (8-15). It remains unknown if the circulating ICs containing other HCV-Ags are present during HCV infection, and if HCV-Ag-specific ICs persist after spontaneous or treatment-induced resolution of HCV infection.

Recently, we developed a novel, highly sensitive HCV-Ags enzyme immunoassay (HCV-Ags EIA, or EIA) (16, 17). While using our EIA to test the sera from patients with resolved HCV (R-HCV) infection, we discovered that denaturation of R-HCV serum samples in some cases resulted in positive HCV-Ags EIA tests, like those with V-HCV infections. This prompted our investigation to determine if the positive results in the R-HCV individuals were false positives or due to persistence of HCV-Ag-specific ICs. In the present study, our results demonstrated persistence of various HCV-Ag-specific ICs in the sera of some R-HCV patients, despite lacking HCV viremia for many years. The HCV-Ag-specific ICs in R-HCV infection were characterized, and multivariate analysis identified significant associations between persistent HCV-Ag-specific ICs and clinical and virologic aspects in R-HCV individuals.

## **Patients and Methods**

**Serum Specimens and Clinical Data Collection.** The present study was approved by our IRB. After obtaining informed consent, serum specimens were collected and stored at -80°C. A total of 68 patients with either spontaneously (n=7), or treatment-induced (n=61) R-HCV infection, and 34 cases with V-HCV infection participated (Table 1). The definition of R-HCV infection required a



clinical history of HCV infection, positive anti-HCV test and  $\geq 2$  undetectable serum HCV RNA RT-PCR tests performed 2-3 months apart. In 61 cases of treatment-induced R-HCV infection, the mean duration of HCV clearance was 34.5 months (6-240 months) and 35 (51.4%) had clinical or histological evidence of cirrhosis. In 57 cases with HCV genotype (GT) test, its distribution was: GT1=34; and non-GT1=23 (Table 1). Clinical and laboratory data were also collected.

Anti-HCV testing was performed using the Architect Anti-HCV Assay, a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Serum HCV RNA was quantitated using the Abbott RealTime HCV assay, which has a limit of 12 IU/mL for both the lower limit of detection limit and quantitation (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) (16, 17).

**Main Reagents and HCV-Ags EIA Assay.** As previously reported, monoclonal antibodies (mAbs) against HCV core antigen, NS3, NS4b and NS5a were produced in our laboratory with the same specificity to commercial corresponding mAbs (16, 17). A highly sensitive and specific HCV-Ags EIA assay was used to test serum pre-treated with denaturation or non-denaturation (16, 17).

**Immunoprecipitation and Western Blot.** As previously reported (16-18), immunoprecipitation and Western blot (IP-WB) assay were performed to confirm the presence of HCV-Ag-specific ICs and characterize their HCV-Ags. HCV-Ags binding to HCV-Ag-specific mAbs were immunoprecipitated using anti-human IgG. WB was then used to confirm the human IgG bound to HCV-Ags. Additionally, IP was also used with anti-human IgG to capture all HCV components bound to human IgG in 2 mL serum specimens. HCV RNA RT PCR was then performed on the precipitated components.

**Statistical Analysis.** Categorical data were expressed as percentages, and continuous data were expressed as the mean and standard deviation. The student T test, Chi-square test, and logistic regression correlation were used for statistical analyses using SPSS software. A p value  $< 0.05$  was considered significant.

## Results

**Presence of Bound HCV-Ags in Serum Specimens with V-HCV or R-HCV Infection.** When developing our HCV-Ags EIA assay, we found that serum denaturation before HCV-Ags EIA resulted in unexpected positive tests in some patients with R-HCV infection (16). To further assess whether this was due to false positive tests or persistence of HCV-Ags in ICs, HCV-Ags EIA was used to test 34 patients with V-HCV infection and 68 patients with R-HCV infection (Table 1). All 34 sera with V-HCV infection were tested positive, with or without denaturation of the serum

sample before testing. Serum denaturation also increased the EIA OD values in all V-HCV cases, indicating that HCV-Ags were present in sera in both free and bound patterns in these patients. Although none of 68 sera with R-HCV infection were tested positive for HCV-Ags using non-denaturation method, 39 (57.4%) were tested positive for serum HCV-Ags EIA using sample denaturation, including 35 cases with treatment-induced; and 4 cases with spontaneous HCV clearance (Table 1). The necessity of the serum denaturation for detection of HCV-Ags in R-HCV sera indicated that the HCV-Ags were bound, possibly within ICs, and not freely present in these sera, as observed in V-HCV case (Tables 1 and 2).

**Confirmation of HCV-specific-Ag ICs in Serum from R-HCV Infection.** To further assess ICs containing HCV-Ags, the IP-WB assay was used to determine if the HCV-Ags detected by HCV-Ags EIA in those serum specimens were HCV-Ag specific and contained within ICs. A pool of mAbs specific for HCV core, NS3, NS4b, and NS5a Ags were used to immunoprecipitate all HCV-Ags present in eight serum specimens, followed by WB assay using anti-human IgG antibody. As shown in Figure 1, human IgG (150 KD) bound specifically to HCV-Ags was detectable in cases with V-HCV infection (panels 1-2, positive controls) and with R-HCV infection (panels 4-8), but were not detected in the control serum from an individual without HCV infection (panel 3, negative control). It should be noted that panels 7-8 had R-HCV infection, and tested negative for serum HCV-Ags EIA, indicating that IP-WB might be more sensitive for detecting HCV-ICs than the serum HCV-Ags EIA. These results confirmed the presence of the HCV-Ags specifically bound to IgG. Thus, HCV-Ags-specific ICs are present in the serum specimens of patients not only with V-HCV infection, but also some cases with R-HCV infection (Table 2). These findings also provided further support to our above observation that the denaturation of serum releases HCV-Ags sequestered or bound within ICs for detection using our HCV-Ags EIA.

We then assessed if these HCV-Ags-specific ICs contained all 4 HCV-Ags, using single mAb against HCV core, NS3, NS4b, or NS5a Ag in the IP-WB assay of the same 8 samples. As shown in Figure 2, using the IP-WB assay, we demonstrated the presence of human IgG (150 KD) specifically bound to each of the 4 individual HCV-Ags (HCV core, NS3, NS4b, and NS5a) in cases with V-HCV infection (panels 1-2) and cases with R-HCV infection (panels 4-8). The results were negative in the individual without prior HCV infection (panel 3). Thus, each of the individual HCV core, NS3, NS4b, and NS5a Ag-specific HCV-ICs is present in serum specimens in some cases with R-HCV infection without HCV replication.

In addition to HCV core, NS3, NS4b, and NS5a Ag-containing HCV ICs, HCV E1- and E2 Ag-specific ICs were also detectable in all specimens from patients with V-HCV infection (cases 1

and 2) and R-HCV infection (cases 4-8), but not in the control case 3 without HCV infection (data not shown).

**HCV-IC Containing Virions in Serum Specimens with V-HCV, but not R-HCV Infection.** Since almost all HCV structural and NS proteins were detected in cases with R-HCV infection, we questioned whether complete HCV virions were bound within HCV-specific ICs. To detect HCV RNA, a surrogate for HCV virions, within ICs, HCV RNA RT PCR was performed on the IgG immunoprecipitates from 2ml of the sera in 12 cases: 2 negative controls without prior HCV infection, 2 with V-HCV infection, 4 with R-HCV infection and positive HCV-Ags EIA test results, and 4 with R-HCV infection and negative HCV-Ags EIA test results. HCV RNA was positive in both cases with V-HCV infection, but undetectable in the sera of the controls without prior HCV infection, and in all 8 serum isolates with R-HCV infection, regardless of the result of the serum HCV-Ags EIA. Thus, HCV virions are bound within ICs in V-HCV infection, but not in R-HCV infection (Table 2).

**Persistent HCV ICs and Clinical Presentation in Patients with R-HCV Infection.** To assess the clinical relevance of the HCV ICs in cases with R-HCV infection, we compared 11 clinical and laboratory variables in cases with vs. without detectable serum HCV-Ags-specific ICs. As summarized in Table 3, multivariable analysis with multinomial regression showed significant associations of persistence of HCV ICs with age and presence of cirrhosis in cases with R-HCV infection, independently to race and HCV GT. It should be noted that only 1 of 13 cases had pre-treatment cryoglobulins; thus, cryoglobulinemia was not included in the above analysis.

## **Discussion**

Circulating HCV-specific ICs have been demonstrated in patients with V-HCV infection that might be associated with HCV-related extrahepatic manifestations and negative impact to the efficiency of IFN treatment (8-14). It remains largely unknown what HCV protein(s) could form HCV ICs, how frequent, and how long these HCV ICs after HCV clearance, and how those HCV ICs are associated with HCV RNA and the clinical presentation, extrahepatic manifestations, and the related pathogenesis.

Recently, in the course of developing our HCV-Ags EIA, we found that denaturation of the sera resulted in detection of HCV-Ags not only in those with V-HCV infection, but also in 51.4% of the patients with R-HCV infection (16). These data not only indicated the possible presence of HCV-Ags in R-HCV infection, but also prompted us to pursue the present study to further address this novel discovery.

First, using HCV-Ags EIA with sera non-denaturation and denaturation, HCV-Ags were detectable in all 34 sera from patients with V-infection, and sera denaturation further increased HCV-Ags signals in all the cases, indicating the presence of both free and bound HCV-Ags during V-HCV infection. On the other hand, using the same HCV-Ags EIA and sera non-denaturation method, none of the 68 tested serum specimens from R-HCV infection had detectable HCV-Ags, ie, no free HCV-Ags in these patients. However, consistent to our preliminary studies (16), in 57.4% of those 68 sera, HCV-Ags were detectable after the sera denaturation, indicating presence of HCV-Ags in bound, but not free pattern in these patients.

Using IP-WB with pooled antibodies to HCVcAg, NS3, NS4b and NS5a to immunoprecipitate HCV-Ags, followed by anti-human IgG detection, we confirmed the positive HCV-Ags EIA signal was not only HCV-specific, but also human IgG bound, ie, HCV-Ag-specific ICs, in R-HCV as well as V-HCV infection. To define the feature of HCV-specific ICs, the same sera were further tested by the same IP-WB, but using each single HCV mAb to immunoprecipitate the corresponsive individual HCV-specific IC. For the first time, we demonstrated the simultaneous presence of HCVcAg, E1/E2, NS3, NS4b, and NS5a specific HCV ICs in the serum specimens with R-HCV infection as well as V-HCV infection. Furthermore, these HCV-ICs could be persistent for as long as 20 years after HCV clearance.

These results, together with the HCV-Ags EIA findings that serum denaturation could further increase HCV-Ags signals in V-HCV infected sera, indicated that both free and bound HCV-Ags, ie HCV ICs are present in patients with V-HCV infection. On the other hand, the need of sera denaturation for positive HCV-Ags EIA testing results and the presence of HCV ICs by IP-WB assay in some of the sera from R-HCV infection confirmed the persistence of only bound or sequestered (ie, ICs), but not free HCV-Ags, in these patients with R-HCV infection.

It should be noted that using IP-WB assay, HCV-specific ICs could be detectable in serum specimens with negative HCV-Ags EIA results, indicating IP-WB is more sensitive than HCV-Ags EIA in identifying bound HCV-Ags. Thus, it is possible that the actual incidence of persistent circulating HCV ICs during R-HCV infection could be higher than 57.4% as determined by HCV-Ags EIA, if IP-WB assay is employed.

One study reported that HCV RNA could be detectable in sera or peripheral blood mononuclear cells after HCV clearance (19). Having demonstrated the persistence of various HCV ICs in R-HCV infection, we then assessed whether HCV virions could also be present in these HCV-specific ICs that might be undetectable by routine serum HCV RNA PCR assay. Using anti-human IgG to immunoprecipitate all IgG bound components from sera, then sensitive HCV RNA

RT PCR (lowest detection limit of 12 IU/mL), 2 cases with V-HCV infection were tested positive and 2 other cases never had HCV infection were negative for HCV RNA. However, none were tested positive for HCV RNA from all 8 sera with R-HCV infection (4 with positive and 4 with negative HCV-Ags EIA test results). Although the sample size was small, our data indicated only HCV virion-free ICs persist during R-HCV infection.

Taken together, for the first time, we demonstrated persistence of circulating HCV-specific ICs related to almost all HCV proteins in patients with R-HCV infection, ie, 6 months to 20 years after spontaneous or treatment-induced HCV clearance. Additionally, we also demonstrated that the profile of HCV-Ag ICs can be different depending on HCV infection status. That is in V-HCV infection, both types of HCV-Ags-specific ICs, virion-free and virion-containing, are present; whereas, during R-HCV infection, only virion-free, but not virion-containing HCV-Ags-specific ICs are present.

To determine the clinical relevance of persistent circulating HCV-Ag-specific ICs in patients with R-HCV infection, we performed further comparative studies. We found in 11 clinical variables summarized in Table 3, the persistence of HCV-Ags-specific ICs were significantly associated with age and presence of cirrhosis in patients with R-HCV infection, independent to race and HCV GT. However, it should be noted that such conclusion was based on analysis of a small sample cohort.

Clearly, the clinical relevance of persistent HCV-Ags specific ICs after HCV clearance remains to be determined by further studies using large sample size, preferably including those with history of cryoglobulinemia and other extrahepatic manifestations. The results of the present study also provides rationale to further study if persistent and what kind of subtype of HCV-Ags specific IC could be involved in risks of HCV transmission in transfusion medicine, hepatocarcinogenesis, and HCC development after spontaneous or treatment-induced sustained clearance of HCV infection, ie, SVR.

## References

1. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatol* 2014; 61:S45–S57.
2. Hanafiah KM, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013; 57:1333–1342.
3. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2013; 61

(Suppl.):S58–S68.

4. AASLD/IDSA HCV Guidance Panel. Hepatitis C Guidance: AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus. *Hepatology* 2015; 62:932-954.
5. Gutierrez JA, Lawitz EJ, Poordad F. Interferon-free, direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C. *J Viral Hepatol* 2015; 22:861-870.
6. van der Meer AJ, Veldt BJ, Feld JJ, Wedemeyer H, Dufour J-F, Lammert F, Duarte-Rojo A, Heathcote EJ, Manns MP, Kuske L, Zeuzem S, Hofmann WP, de Knegt RJ, Hansen BE, Janssen HLA. Association between sustained virological response and all-cause mortality among patients with chronic hepatitis C and advanced hepatic fibrosis. *JAMA*. 2012; 308:2584-2593.
7. Lohmann V. Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013; 369:167-98.
8. Choo SH, So HS, Cho JM, Ryu WS. Association of hepatitis C virus particles with immunoglobulin: a mechanism for persistent infection. *J Gen Virol* 1995; 76:2337–2341.
9. Stokes MB. Immune Complex Glomerulonephritis in Patients with Hepatitis C. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2000; 11:396-404.
10. Sansonno D, Lauletta G, Nisi L, Gatti P, Pesola F, Pansini N, Dammacco F. Non-enveloped HCV core protein as constitutive antigen of cold-precipitable immune complexes in type II mixed cryoglobulinaemia. *ClinExpImmunol* 2003; 133:275–282.
11. Sansonno D, Dammacco F. Hepatitis C virus, cryoglobulinaemia, and vasculitis: immune complex relations. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:227–236.
12. Tsai JF, Jeng JE, Chang WY, Ho MS, Lin ZY, Tsai JH. Circulating immune complexes in chronic hepatitis C. *ClinImmunolImmunopathol*. 1995; 75:39-44.
13. Fujita N<sup>1</sup>, Kaito M, Tanaka H, Horiike S, Urawa N, Sugimoto R, Konishi M, Watanabe S, Adachi Y. Hepatitis C virus free-virion and immune-complex dynamics during interferon therapy with and without ribavirin in genotype-1b chronic hepatitis C patients. *J Viral Hepatol*. 2006,13:190-198.
14. Fujita N<sup>1</sup>, Kaito M, Takeo M, Horiike S, Tanaka H, Ikoma J, Watanabe S, Adachi Y. Different hepatitis C virus dynamics of free-virions and immune-complexes after initiation of interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2003; 39:1013-1019.
15. Laperche S, Le Marrec N, Simon N, Bouchardeau F, Defer C, Maniez-Montreuil M, et al. A new HCV core antigen assay based on disassociation of immune complexes: an alternative to

- molecular biology in diagnosis of early HCV infection. *Transfusion* 2003; 43:958-962.
16. Hu K-Q, Cui W. A Highly Specific and Sensitive Hepatitis C Virus Antigens Enzyme Immunoassay (HCV-Ags EIA) for One-step Diagnosis of HCV Infection. *Hepatology* 2016; 64:415-424.
  17. Hu K-Q, Cui W. Application of a Novel Hepatitis C Virus Antigens Enzyme Immunoassay (HCV-Ags EIA) for One-step Diagnosis of Active HCV Infection Using Urine Specimens. Accepted by 2015 AASLD annual meeting, San Francisco.
  18. Cui W, Yu CH, Hu KQ. In vitro and in vivo effects and mechanisms of celecoxib-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res.*2005; 11:8213-8221.
  19. Pham TNQ, MacParland SA, Mulrooney PM, Cooksley H, Naoumov NV, Michalak TI. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment-induced resolution of hepatitis C. *J Virol*, 2004; 78:5867–5874.

**Table1. Baseline Characteristics and Serum HCV-Ags EIA Test Results**

<b>Variables</b>	<b>V-HCV Infection</b>	<b>R-HCV Infection</b>
Case number	34	68
Mean age	59.8 (19-84)	59.2 (19-85)
Males: females	15:19	35:33
Race (White, Asian, Hispanic, Others)	15:13:2:4	32:21:10:4
Anti-HCV+	34 (100%)	69 (100%)
Mean HCV RNA (log IU/mL)	5.53 (4-7)	All undetectable
HCV GT1 vs. non-1	22 vs. 12 (64.7 vs. 35.3%)	34 vs. 23 (59.6% vs. 40.4%)
Cirrhosis	15 (44.1%)	35 (51.5%)
Mean HCV clearance (moths)	N/A	34.5 (3-240)
H/o of HCV Rx	0 (0%)	61 (89.7%)
HCV-Ags EIA+ by non-denaturation	34 (100%)	0 (0%)
HCV-Ags EIA+ by denaturation	34 (100%)	39 (57.4)

N/A: not applicable

**Table 2. The Presence of Various HCV Components in Sera with V-HCV Vs. R-HCV Infection**

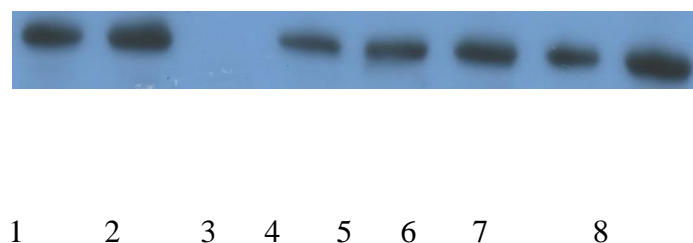
<b>HCV Component in Serum Specimens</b>	<b>V-HCV Infection</b>	<b>R-HCV Infection</b>	<b>Methods Used to Confirm</b>
Free HCV-Ags	Yes	No	HCV-Ags EIA without denaturation
Bound HCV-Ags	Yes	Yes	HCV-Ags EIA with denaturation
Virion-free HCV-Ags ICs	Yes	Yes	IP-WB
Virion-containing HCV-Ags ICs	Yes	No	IP-HCV RT RNA PCR

**Table 3. Univariate and Multivariate Analysis for Serum HCV-ICs and Clinical Variables**

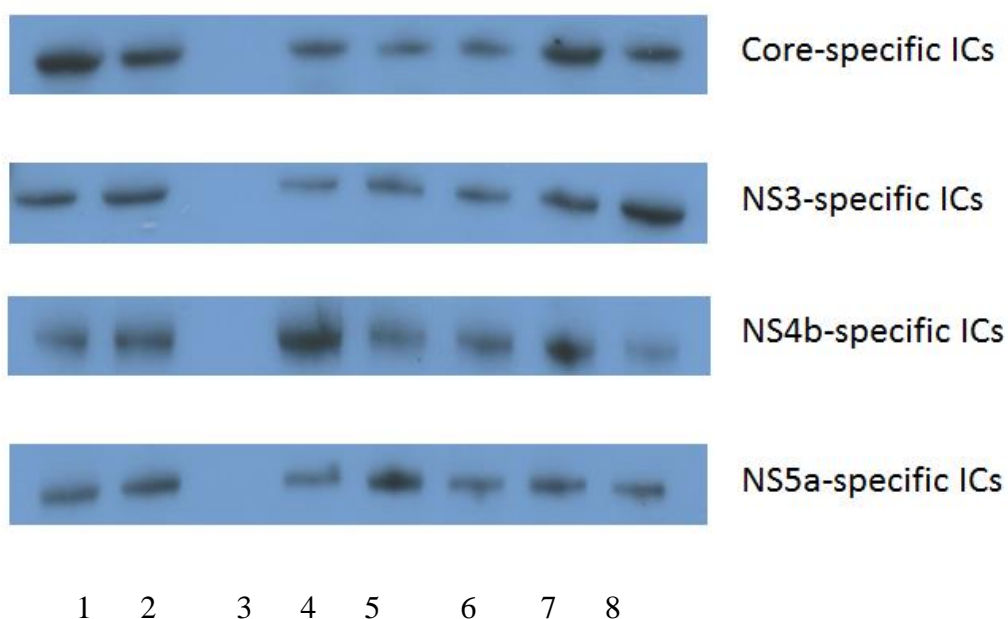
<b>Variables</b>	<b>N=</b>	<b>Positive HCV ICs (%)</b>	<b>Univariable Analysis P value</b>	<b>Multivariable Analysis P value</b>
<b>Age (<math>\leq</math> vs. <math>&gt;</math> 50 yrs)</b>	68	16 (41.0) vs. 23 (59.0)	0.39	0.025
<b>Gender (M vs. F)</b>	68	20 (57.1) vs. 19 (57.4)	0.97	
<b>Race: White</b>	21	14 (66.7)	0.01	0.262
<b>Asian</b>	32	16 (50.0)		
<b>Hispanic</b>	10	9 (90.0)		
<b>Others</b>	5	0 (0.0)		
<b>HCV genotype (1 vs. Non-1)</b>	57	22 (64.7) vs. 10 (43.5)	0.11	0.25
<b>Cirrhosis (no vs. yes)</b>	39	22 (66.7) vs. 17 (48.6)	0.13	0.003
<b>HCV Rx history (no vs. yes)</b>	68	4 (57.1) vs. 35 (57.4)	0.99	
<b>Rx Regimen (INF-based vs. DAA)*</b>	61	20 (62.5) vs. 15 (51.7)	0.69	
<b>HCV clearance (<math>&lt;</math> 12 vs. <math>\geq</math>12 mons)</b>	61	18 (58.1) vs. 17 (56.7)	0.91	
<b>Post-Rx ALT (<math>&lt;</math> 40 vs. <math>\geq</math> 40 IU)**</b>	67	32 (64.0) vs. 7 (41.2)	0.99	
<b>Post-Rx AST <math>&gt;</math> 40 IU***</b>	67	30 (62.5) vs. 9 (47.4)	0.26	



**\*INF-based vs. DAA:** interferon-based regimens vs. direct antiviral agents; **\*\*Post-Rx ALT:** ALT level after HCV treatment and at the time of sample collection; **\*\*\*Post-Rx AST > 40 IU:** ALT level > 40 IU after HCV treatment and at the time of sample collection



**Figure 1. HCV Specific Ags Bond to Human IgG (ie, HCV Specific ICs) Detected by Pooled HCV Core, NS3, NS4b, or NS5a Antibodies in Sera with V-HCV Vs. R-HCV Infection.** Panel 3, serum from negative control; panels 1 and 2, sera from individuals with V-HCV infection; panels 4-8, sera from individuals with R-HCV infection and positive HCV-Ags EIA (panels 4-6) or negative HCV-Ags EIA results (panels 7-8).



**Figure 2. Serum HCV-Ags-specific ICs Detected by Individual HCV Core, NS3, NS4b, or NS5a**

**Antibody and IP-WB from V-HCV Vs. R-HCV Infection.** Panel 3, serum from negative control; panels 1 and 2, sera from individuals with V-HCV infection; panels 4-8, sera from individuals with R-HCV infection and positive HCV-Ags EIA (panels 4-6) or negative HCV-Ags EIA results (panels 7-8). Raw 1, HCV core specific ICs; raw 2, HCV NS3 specific ICs; raw 3, HCV NS4b specific ICs; and raw 4, HCV NS5a specific ICs.

本文发表于《**Digestive Diseases and Science**》2018年第63卷

# 鼠李糖乳杆菌培养上清液通过抑制NF- $\kappa$ B通路预防大肠杆菌性脑膜炎的体外研究

曾庆

曹虹

南方医科大学公共卫生学院微生物学系, 广东 广州 510623

**Abstract:** *Objective* To investigate whether *Lactobacillus rhamnosus* GG conditioned medium (LGG-CM) has preventive effect against *E. coli* K1-induced neuropathogenicity in vitro via inhibit NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Methods* Thein vitro blood-brain barrier (BBB) model was constructed by human brain microvascular endothelial cell (HBMEC). Effect of LGG-CM on *E. coli*-activated NF- $\kappa$ B signaling pathway was determined using Western blotting. Invasion assay and polymorphonuclear leukocyte (PMN) transmigration assay were performed to explore whether LGG-CM could inhibit *E. coli* invasion and PMN transmigration across the BBB in vitro. Expressions of ZO-1 and CD44 were detected using Western blotting and immunofluorescence. Changes of trans-epithelial electric resistance (TEER) and bacterial translocation were determined to evaluate the BBB permeability. *Results* Pre-treatment with LGG-CM inhibited *E. coli*-activated NF- $\kappa$ B signaling pathway in HBMEC, and, thereby decreased the invasion of *E. coli* K1 as well as transmigration of PMN. Western blotting shown that LGG-CM could alleviate *E. coli*-induced up-regulation of CD44 and down-regulation of ZO-1 expressions in HBMEC. Moreover, pre-treatment with LGG-CM could alleviate *E. coli* K1-induced reduction of TEER as well as decrease bacterial translocation across the BBB in vitro. *Conclusion* LGG-CM can block *E. coli*-induced activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway, and thereby prevent *E. coli* K1-induced neuropathogenicity by decreasing *E. coli* K1 invasion rates and PMN transmigration.

**Keywords:** *Lactobacillus rhamnosus* GG conditioned medium, Blood-brain barrier, Human brain microvascular endothelial cell, *E. coli* K1, NF- $\kappa$ B

大肠杆菌*E. coli* K1是引起新生儿菌血症和脑膜炎最常见的革兰阴性菌<sup>[1]</sup>。最近的研究表明*E. coli* K1在侵袭血脑屏障并引发脑膜炎的过程中有着典型的三联症特征,即NF- $\kappa$ B信号通路激活、细菌侵袭脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cell, BMEC)以及中性粒细胞迁移穿越血脑屏障<sup>[2-3]</sup>。*E. coli* K1引起的三联炎症是一个动态过程:首先,*E. coli* K1毒力蛋白IbeA结合脑微血管内皮细胞的波形蛋白,激活NF- $\kappa$ B信号通路。其次,激活的NF- $\kappa$ B信号通路可改变BMEC的脂筏分布及骨架蛋白表达,引发*E. coli* K1侵袭并穿越血脑屏障,进入脑内。最后,*E. coli* K1引起脑内炎症因子和趋化因子释放,募集中性粒细胞迁移和穿越血脑屏障进入炎症灶,进一步加重炎症反应<sup>[4-6]</sup>。由此可见,NF- $\kappa$ B信号通路的激活在*E. coli*

K1脑膜炎的发病中起着至关重要的作用，且前期实验中我们发现NF- $\kappa$ B信号通路抑制剂可以抑制细菌性脑膜炎三联征的发生<sup>[2]</sup>。

NF- $\kappa$ B作为一种信号转导途径的枢纽，在许多生理、病理过程发挥了重要作用<sup>[7-8]</sup>。抑制NF- $\kappa$ B通路激活不仅可调节某些生理活动，同时也可预防和治疗一些相关疾病。尽管目前已经发现许多种类的NF- $\kappa$ B抑制剂，但是大部分抑制剂都存在许多不足，因此，目前为止只有少数抑制剂应用于临床<sup>[9]</sup>。开发新的NF- $\kappa$ B信号途径抑制剂已成为药物研发的热点和趋势。目前研究表明鼠李糖乳杆菌的培养上清液（*Lactobacillus rhamnosus* GG conditioned medium, LGG-CM）有着类似于LGG菌体本身的益生作用，对其益生作用机制的研究也逐渐成为了热点。本课题组前期研究发现LGG-CM能抑制肠上皮细胞NF- $\kappa$ B信号通路激活，但是对于其能否抑制基于NF- $\kappa$ B通路的*E. coli* K1三联炎症却未有报道。因此，本研究探讨了LGG-CM能否预防*E. coli* K1三联炎症并初步研究了其相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞、菌株及用到的试剂

HBMEC和大肠杆菌*E. coli* K1由南方医科大学微生物学系保存，鼠李糖乳杆菌（LGG）由美国南加州大学洛杉矶儿童医院黄胜和教授惠赠。乳杆菌培养基（De Man, Rogosa, and Sharpe broth, MRS）购于广东环凯微生物科技有限公司，脑心浸液培养基（brain heart infusion, BHI）购于美国BD公司。胎牛血清购于德国PAN生物科技公司，RPMI 1640基础培养基购于赛默飞生物科技公司。兔抗ZO-1、p65和CD44抗体均购于英国Abcam公司。0.22 $\mu$ m滤器和截留量为30 KDa的超滤蛋白浓缩管购于美国Millipore公司。其它细胞培养器材，如Transwell小室、24孔和6孔细胞培养板均购于美国Corning公司。人外周血中性粒细胞分离液Polymorphprep购于挪威Axis-Shield公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 LGG-CM的制备

LGG接种于MRS培养基中，置于37 $^{\circ}$ C培养24小时。将菌液离心取上清，用0.22  $\mu$ m的滤膜过滤除菌。将上清液装入浓缩管中，在4 $^{\circ}$ C条件下以4000r/min的转速离心40min。因为研究报道的LGG上清活性成分主要集中于蛋白分子量 $\geq$ 30 KDa部分，我们的预实验结果也表明相对于 $<$ 30kDa组分， $\geq$ 30kDa组分确实能明显抑制*E. coli* K1侵袭HBMEC。因此，在本研究中，

所有的实验均使用 $\geq 30$ kDa组分。

### 1.2.2 体外细胞侵袭实验

HBMEC接种于24孔板中培养，待细胞汇合后，弃去培养液，用PBS清洗3次，将LGG-CM与无抗生素培养基按不同体积混合，配置成如下几个实验组：0.5%（5:1000）、1%（10:1000）、2%（20:1000），每组设3个复孔。用上清处理1h后，向每孔中加入 $1 \times 10^7$ 菌落形成单位（colony formation unit, CFU）的*E. coli* K1，使感染复数（multiplicity of infection, MOI）达到100:1。37°C，5%CO<sub>2</sub>培养箱中共同孵育1.5 h。用PBS清洗细胞三次，再加入含有100 μg/ml庆大霉素的培养基，37°C，5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育1h，以杀死细胞外细菌。再用PBS清洗3次，加入100 μl的0.5% tritonx-100。置于培养箱中处理8分钟，立即加入100 μl蒸馏水终止裂解。反复吹打后，吸出细胞裂解液，梯度稀释后涂板计数菌落数。侵袭率=胞内存活细菌数/加入细菌数 $\times 100\%$ ，重复3次取平均值，以单独感染*E. coli* K1组为100%，计算相对侵袭率。

### 1.2.3 PMN细胞迁移实验

取人外周血约10ml，按Polymorphprep中性粒细胞分离液说明书分离中性粒细胞（polymorphonuclear granulocyte, PMN）。将HBMEC接种于Transwell小室上层，待细胞汇合后继续生长四天用于后续实验。设置对照组、*E. coli* K1组和2% LGG-CM+*E. coli* K1三组，每组分别加PBS或2% LGG-CM预处理1小时。然后向下室中加入 $2 \times 10^5$  CFU的*E. coli* K1处理2h。再向上室中加入 $1 \times 10^6$ 个PMN处理4h，最后取Transwell下层培养液用血球计数板计数迁移至下层的PMN数量。

### 1.2.4 免疫印迹检测各组ZO-1，CD44和p65蛋白的表达

细胞分组如1.2.3，将细胞培养于6孔板中。细菌处理完毕后，按试剂盒说明书，裂解并提取细胞核蛋白及胞质蛋白。取10μl变性后的蛋白进行蛋白电泳。截取相应分子量的蛋白胶，将蛋白转至PVDF膜。然后用5%脱脂奶粉封闭1h，分别加入兔抗ZO-1、CD44、p65及 $\beta$ -actin抗体，4°C孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1h，TBST洗三次，上机观察各组蛋白表达量。

### 1.2.5 跨内皮细胞电阻检测

将HBMEC消化和接种至Transwell上室，下室中加入1ml培养液，待细胞汇合后继续生长4天。用跨内皮细胞电阻（transendothelial electrical resistance, TEER）评价体外血脑屏障的完整性，实验分组和处理情况同1.2.1，加入 $1 \times 10^6$  CFU的*E. coli* K1于Transwell上室感染细胞。在感染后的第0、1、2、3、4、5小时用EVOM2电阻仪检测TEER值，方法严格按照说明书。记录各个时间段的电阻值，作出变化曲线。在第5 h取Transwell下层培养液涂板，计算下层细菌数量。

### 1.2.6 免疫荧光技术检测各组细胞间ZO-1蛋白的形态及分布

实验分组同1.2.3，处理完后，加入4%多聚甲醛固定10分钟，弃去液体，预冷的PBST清洗3次，加入200 ul封闭液（含5% BSA的PBST）室温孵育2 h，弃去封闭液加入100 ul兔抗ZO-1抗体稀释液，4℃孵育过夜。然后用预冷的PBST清洗3次，加入Alexa Fluor 488包被的二抗稀释液，室温避光孵育1h，弃去二抗，PBST清洗3次。最后加入10 μg/ml 的细胞核荧光染料DAPI孵育10min，用荧光显微镜观察ZO-1蛋白的分布。

### 1.2.7 统计学处理

用SPSS 20.0软件对所有数据进行单因素方差分析，统计数据皆采用均数±标准差表示，以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LGG-CM能够抑制*E. coli* K1激活NF-κB通路

细胞经受相关外界因素刺激后，可激活NF-κB通路，活化的p65可从细胞质进入细胞核启动相关基因表达。因此，细胞核中的p65蛋白表达增加表明NF-κB通路处于激活状态。免疫印迹实验结果显示（图1A, B）：经*E. coli* K1处理后，细胞核中的p65含量明显增加，表明*E. coli* K1可激活HBMEC的NF-κB通路。LGG-CM预处理能够明显下调*E. coli* K1引起的细胞核中p65蛋白上升（\*\* $P < 0.01$ ）。这些结果表明LGG的培养上清液可抑制*E. coli* K1激活NF-κB信号通路。

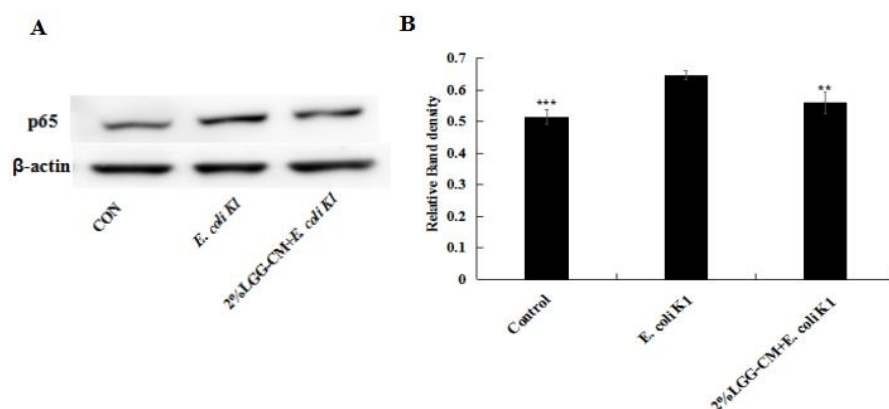


图1 LGG-CM对*E. coli* K1激活NF-κB通路的影响

Fig.1 Effects of LGG-CM on *E. coli*-activated NF-κB pathway. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P = 0.000$  vs *E. coli* K1.

## 2.2 LGG-CM可抑制*E. coli* K1侵袭HBMEC

NF-κB通路激活可介导后续的*E. coli* K1侵袭和PMN迁移<sup>[2]</sup>，因此，我们后续研究了LGG-CM是否可抑制*E. coli* K1侵袭HBMEC。实验结果显示（图2），随着LGG-CM的浓度增高，抑制*E. coli* K1侵袭的能力也增强（\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P = 0.000$ ），其抑制效果呈剂量依赖性。

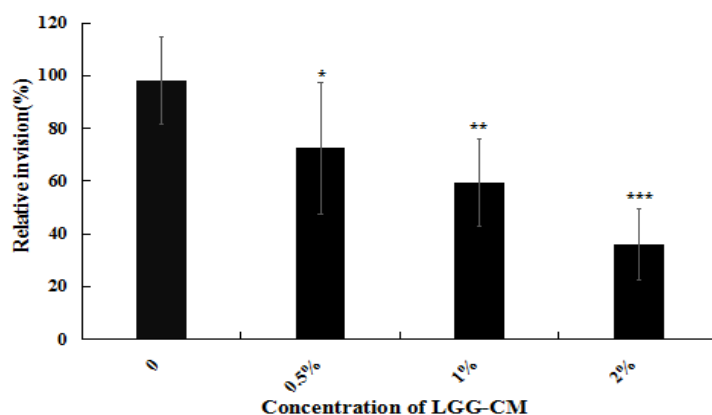


图2 LGG-CM对*E. coli* K1侵袭HBMEC的影响

Fig.2 Effects of LGG-CM on invasion of *E. coli* K1 to HBMEC. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P = 0.000$  vs control.

## 2.3 LGG-CM抑制PMN迁移及下调CD44的表达

PMN迁移是引发细菌性脑膜炎的重要因素之一，黏附分子CD44在PMN迁移的过程中发挥了重要作用。实验中我们分别检测了LGG-CM对PMN迁移及HBMEC中CD44表达的影响。

PMN细胞迁移实验结果如图3：对照组及LGG-CM处理组PMN相对迁移率明显低于*E. coli* K1组（\* $P < 0.05$ ，\*\*\* $P = 0.000$ ）。免疫印迹结果显示（图4A, B）：对照组及LGG-CM处理组HBMEC的CD44表达量明显低于*E. coli* K1组（\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ）。

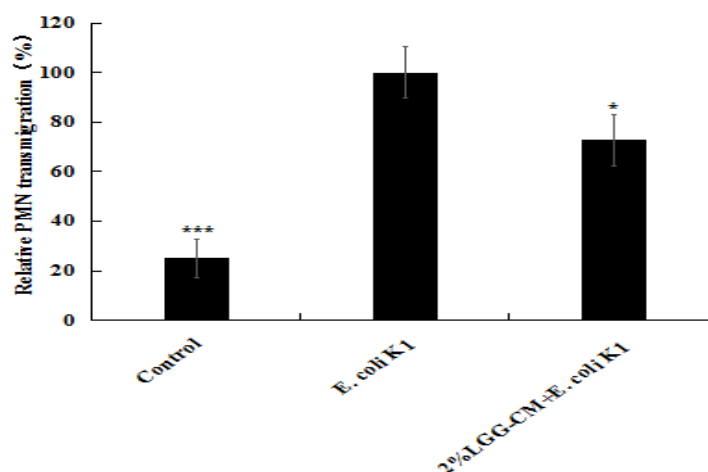


图3 LGG-CM 对*E. coli* K1诱导PMN迁移的影响

Fig.3 Effects of LGG-CM on *E. coli*-induced PMN transmigration.\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs *E. coli* K1 .

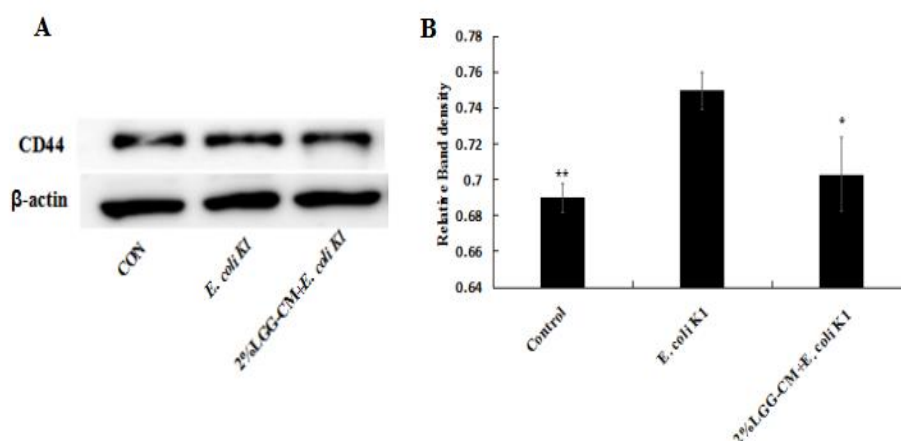


图4 LGG-CM对HBMEC的CD44蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of LGG-CM on the expression of CD44 in HBMEC. A: Western blot analysis; B: Quantitative analysis of relative expression of CD44.\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$  vs *E. coli* K1.

#### 2.4 LGG-CM可抑制*E. coli* K1破坏体外血脑屏障的完整性

实验中将HBMEC接种于Transwell上室模拟体外血脑屏障模型，通过检测TEER值变化和Transwell下层细菌数以验证血脑屏障的完整性和通透性。实验结果如图5所示：LGG-CM能够明显减缓*E. coli* K1引起的TEER值下降（\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P = 0.000$ ），且具有剂量依赖性。取第



5 h下层液体涂板计数细菌（图6），当LGG-CM浓度为2%时，下层细菌CFU明显降低（\* $P<0.05$ ）。

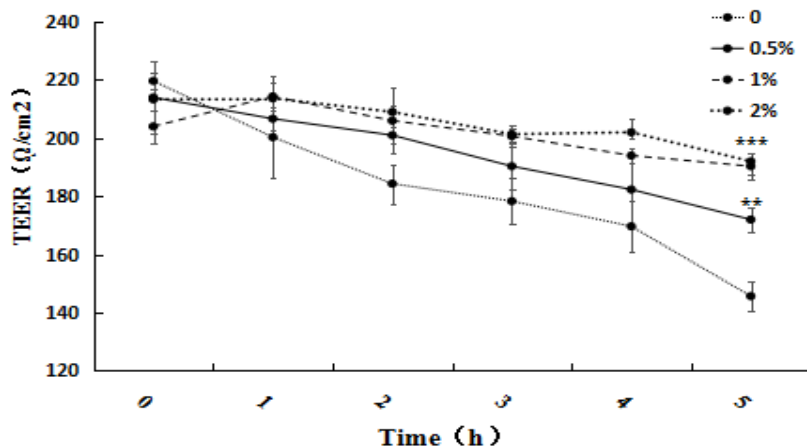


图5 LGG-CM对血脑屏障TEER值的影响

Fig.5 Effects of LGG-CM on TEER value in HBMEC. (\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P=0.000$ vs control)

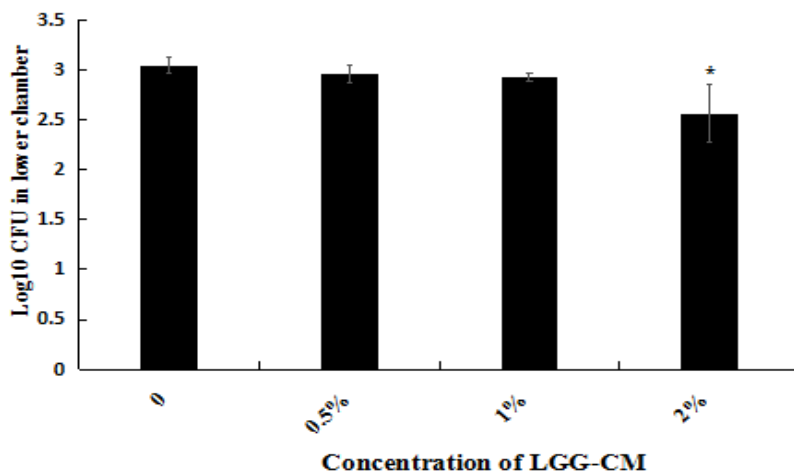


图6 LGG-CM对Transwell下室细菌CFU数量的影响

Fig.6 Effects of LGG-CM on bacterial translocation. (\* $P<0.05$ vs control)

## 2.5 LGG-CM可抑制*E. coli* K1破坏血脑屏障的紧密连接

紧密连接是维持血脑屏障完整性和通透性的重要结构，紧密连接蛋白ZO-1是其重要组成蛋白之一。通过检测ZO-1的表达和分布情况可研究LGG-CM是否能够抑制*E. coli* K1对血脑屏障的破坏。实验中通过免疫印迹及免疫荧光技术观察紧密连接蛋白ZO-1的表达和分布，结果表明如（图7A, B）：感染*E. coli* K1能显著降低ZO-1的表达，而用LGG-CM预处理能够抑制*E. coli* K1下调ZO-1蛋白表达（\*\* $P<0.05$ ）。免疫荧光结果显示（图7C）：*E. coli* K1感染能够

明显破坏ZO-1结构，细胞间ZO-1分布松散且断裂明显，而LGG-CM能显著减轻*E. coli* K1对ZO-1的破坏作用。

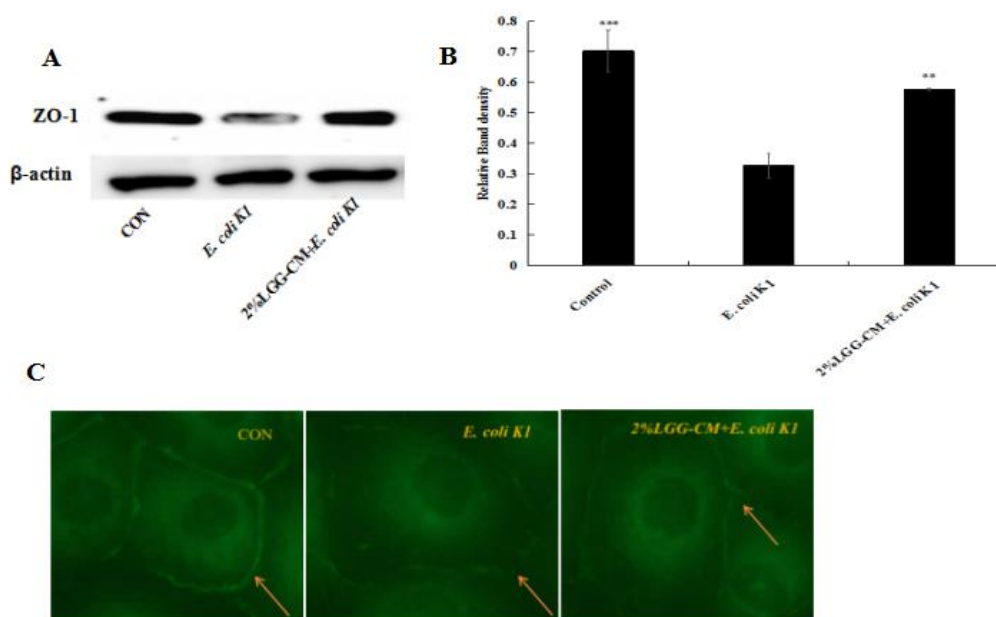


图7 LGG-CM对ZO-1蛋白表达的影响

Fig.7 Effects of LGG-CM on the expression of ZO-1 in HBMEC. A: Western blot analysis; B:Quantitative analysis of relative ZO-1 expression. (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P = 0.000$ vs control). C: Immunofluorescence detection of ZO-1 (Original magnification:  $\times 400$ ).

### 3 讨论

LGG是目前研究最为广泛的益生菌之一，已被证明能有效的预防和治疗某些疾病，如肠道感染、腹泻、全身系统性炎症及过敏性疾病等<sup>[10-12]</sup>。最近的研究发现LGG还能促进新生小鼠肠道发育、预防大鼠肠道癌症及炎症<sup>[13, 14]</sup>。然而，作为一种活的细菌，益生菌的安全性一直受到质疑，有报道称在一些免疫缺陷病人及儿童中使用益生菌会引起菌血症<sup>[15, 16]</sup>，且美国FDA明令禁止对免疫功能不全的未成年儿童使用活的菌株。益生菌上清液作为一种益生菌的代谢产物，其相对于益生菌来说更加安全。有研究表明LGG-CM能降低致病菌和氧化应激引起的肠道损伤<sup>[17, 18]</sup>；通过对小鼠灌服LGG-CM可以降低过敏反应<sup>[19]</sup>及增强单核巨噬细胞的免疫功能<sup>[20]</sup>。许多研究还揭示了益生菌或其产物的肠外益生特性，如通过肠-脑轴影响血脑屏障的形成、脑的运作和调节机体生理活动甚至宿主的行为<sup>[21-23]</sup>。然而目前研究发现的脑益生作用都是由益生菌或其代谢产物直接作用于肠道，通过肠-脑轴传递引发。而在本研究中，我们发现LGG-CM可直接作用于脑微血管内皮细胞，抑制*E. coli* K1对其NF- $\kappa$ B信号通路的激

活，藉此阻断炎症反应的发生。同时我们还发现LGG-CM能够调节血脑屏障的紧密连接蛋白ZO-1表达，抑制*E. coli* K1对血脑屏障的损坏。这些结果初步表明LGG-CM可用于预防和治疗*E. coli* K1引起的脑膜炎。

NF- $\kappa$ B通路的激活是细菌性脑膜炎发生的重要特征之一，其在介导*E. coli* K1侵袭HBMEC及PMN迁移穿过血脑屏障中发挥了重要作用<sup>[2]</sup>。p65蛋白是组成NF- $\kappa$ B通路系统的五种蛋白之一，当NF- $\kappa$ B通路系统被激活时，细胞质中的p65蛋白会进入细胞核中，调节相应的基因表达<sup>[24]</sup>。实验发现LGG-CM能够阻断*E. coli* K1引发的p65核转运，从而抑制NF- $\kappa$ B通路系统的激活。黏附和侵袭是大肠杆菌穿越血脑屏障进入脑内的首要条件<sup>[25]</sup>。本实验中我们通过用不同浓度的上清处理细胞，发现LGG-CM能明显降低*E. coli* K1侵袭HBMEC且具有浓度依赖性。PMN募集是一把双刃剑，尽管它能有效的清除外来入侵细菌，但同时也会引起炎症介质的释放<sup>[26]</sup>，引发和加重炎症反应。CD44作为一种黏附分子，在介导炎症细胞聚集上具有重要作用<sup>[27]</sup>。实验发现LGG-CM能够下调CD44蛋白的表达及穿过血脑屏障PMN的数量。

检测跨内皮细胞电阻值和紧密连接蛋白表达是评价细胞屏障完整性的经典方法<sup>[28, 29]</sup>且已有报道发现益生菌可以维持肠道屏障的完整性<sup>[30, 31]</sup>。本研究发现随着LGG-CM浓度升高，TEER值下降幅度减缓且Transwell下层细菌数量也显著下降，表明LGG-CM能抑制*E. coli* K1破坏血脑屏障，以维持血脑屏障的完整性。紧密连接蛋白是一种与细胞间紧密连接性相关的蛋白，其破坏及重排都会增大细胞间通透性<sup>[32]</sup>，其中ZO-1蛋白是一种典型的与内皮细胞紧密连接相关的蛋白<sup>[33]</sup>，其表达量的多少与细胞间紧密连接性呈正相关。实验中我们发现相对于致病菌组，LGG-CM预处理组可以抑制*E. coli* K1降解ZO-1蛋白，TEER值、下层细菌数量及紧密连接蛋白的检测都证明了LGG-CM能够维持细胞屏障的完整性。

综上所述，本研究发现LGG-CM能够抑制基于NF- $\kappa$ B通路激活的细菌性脑膜炎三联征，表明LGG-CM有望成为预防和治疗细菌性脑膜炎新药物的潜力。但是，LGG-CM成分复杂，到底是哪种活性成分起作用目前还不清楚。已有学者从LGG-CM中分离出P70和P45两种蛋白，发现它们在保护肠道方面具有较好的作用，这对于我们进一步的研究具有重要的指导意义。总之，本研究初步证明LGG-CM能够通过抑制细菌性脑膜炎三联征和维持血脑屏障完整性来预防细菌性脑膜炎的发生。同时，本研究也表明LGG-CM有望成为新的NF- $\kappa$ B通路抑制剂，为该抑制剂的发掘和探究提供了新的研究思路和方向。

## 参考文献:

- [1] Huang SH, Stins MF, Kim KS. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis[J]. *Microbes and infection*, 2000, 2(10): 1237-1244.
- [2] Chi F, Bo T, Wu CH, et al. Vimentin and PSF act in concert to regulate Iba1+ *E. coli* K1 induced activation and nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in human brain endothelial cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35862.
- [3] Wang S, Peng L, Gai Z, et al. Pathogenic Triad in Bacterial Meningitis: Pathogen Invasion, NF- $\kappa$ B Activation, and Leukocyte Transmigration that Occur at the Blood-Brain Barrier[J]. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7.
- [4] Negrini B, Kelleher KJ, Wald ER. Cerebrospinal fluid findings in aseptic versus bacterial meningitis[J]. *Pediatrics*, 2000,105(2):316-319.
- [5] Tuerlinckx D, Bodart E, Garrino MG, et al. Clinical data and cerebrospinal fluid findings in Lyme meningitis versus aseptic meningitis[J].*Eur J Pediatr*, 2003,162(3):150-153.
- [6] Ponka A, Ojala K, Teppo AM, et al. Differential diagnosis of aseptic and bacterial meningitis on the basis of cerebrospinal fluid findings[J].*Duodecim*, 1983,99(7):470-476.
- [7] Jakkampudi A, Jangala R, Reddy B R, et al. NF- $\kappa$ B in acute pancreatitis: Mechanisms and therapeutic potential[J]. *Pancreatology*, 2016.
- [8] Collins P E, Mitxitorena I, Carmody R J. The Ubiquitination of NF- $\kappa$ B Subunits in the Control of Transcription[J]. *Cells*, 2016, 5(2): 23.
- [9] 康文渊, 田菲菲. NF- $\kappa$ B信号通路及抑制剂研究进展[EB/OL].北京: 中国科技论文在线
- [10] Hojsak I, Snovak N, Abdović S, et al. *Lactobacillus* GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J].*Clinical Nutrition*, 2010,29(3):312-316.
- [11] Basu S, Chatterjee M, Ganguly S, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG in persistent diarrhea in Indian children: a randomized controlled trial[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2007,41(8):756-760.
- [12] Zhang L, Li N, des Robert C, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in a gastrostomy-fed infant rat model[J]. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 2006, 42(5): 545-552.
- [13] Yan F, Liu L, Cao H, et al. Neonatal colonization of mice with LGG promotes intestinal development and decreases susceptibility to colitis in adulthood[J]. *Mucosal immunology*, 2016.
- [14] Gamallat Y, Meyiah A, Kuugbee E D, et al. *Lactobacillus rhamnosus* induced epithelial cell

apoptosis, ameliorates inflammation and prevents colon cancer development in an animal model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 83: 536-541.

- [15] Land MH, Rouster-Stevens K, Woods C R, et al. Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy[J]. *Pediatrics*, 2005,115(1):178-181.
- [16] Alvarez-Olmos M I, Oberhelman R A. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy[J].*Clin Infect Dis*, 2001,32(11):1567-1576.
- [17] Yan F, Cao H, Cover TL, et al. Soluble Proteins Produced by Probiotic Bacteria Regulate Intestinal Epithelial Cell Survival and Growth[J]. *Gastroenterology*, 2007,132(2):562-575.
- [18] Tao Y, Drabik K A, Waypa T S, et al. Soluble factors from *Lactobacillus* GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2006, 290(4): C1018-C1030.
- [19] Harb H, van Tol EA, Heine H, et al. Neonatal supplementation of processed supernatant from *Lactobacillus rhamnosus* GG improves allergic airway inflammation in mice later in life[J]. *Clin Exp Allergy*, 2013,43(3):353-364.
- [20] Fong FL, Kirjavainen PV, El-Nezami H. Immunomodulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG)-derived soluble factors on antigen-presenting cells of healthy blood donors[J]. *Sci Rep*, 2016,6:22845.
- [21] Quigley E M M, Shanahan F. The future of probiotics for disorders of the Brain-Gut Axis[J].*Advances in Experimental Medicine & Biology*, 2014, 817:417-432.
- [22] Braniste V, Alasmakh M, Kowal C, et al. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice[J]. *Science Translational Medicine*, 2014, 6(263):263ra158-263ra158.
- [23] Umbrello G, Esposito S. Microbiota and neurologic diseases: potential effects of probiotics[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2016, 14(1): 298.
- [24] Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, et al. Crosstalk between NF-kappaB/p65 and beta-catenin/TCF4/p300 signalling pathways through alterations in GSK-3beta expression during trans-differentiation of endometrial carcinoma cells[J]. *J Pathol*, 2007,213(1):35-45.
- [25] Burns J L, Griffith A, Barry J J, et al. Transcytosis of gastrointestinal epithelial cells by *Escherichia coli* K1[J]. *Pediatr Res*, 2001,49(1):30-37.
- [26] Echchannaoui H, Frei K, Letiembre M, et al. CD14 deficiency leads to increased MIP-2 production, CXCR2 expression, neutrophil transmigration, and early death in pneumococcal infection[J]. *J Leukoc Biol*, 2005,78(3):705-715.
- [27] He X, Shi X, Puthiyakunnon S, et al. CD44-mediated monocyte transmigration across *Cryptococcus neoformans*-infected brain microvascular endothelial cells is enhanced by HIV-1

- gp41-I90 ectodomain[J]. *Journal of biomedical science*, 2016, 23(1): 1.
- [28] Pinton P, Nougayrede J P, Del R J, et al. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009,237(1):41-48.
- [29] Clayburgh D R, Shen L, Turner J R. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease[J]. *Laboratory investigation*, 2004, 84(3): 282-291.
- [30] Mao X, Gu C, Hu H, et al. Dietary *Lactobacillus rhamnosus* GG Supplementation Improves the Mucosal Barrier Function in the Intestine of Weaned Piglets Challenged by Porcine Rotavirus[J]. *PloS one*, 2016, 11(1): e0146312.
- [31] Hsieh C Y, Osaka T, Moriyama E, et al. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*[J]. *Physiological reports*, 2015, 3(3): e12327.
- [32] Lee S W, Kim W J, Jun H O, et al. Angiopoietin-1 reduces vascular endothelial growth factor-induced brain endothelial permeability via upregulation of ZO-2[J]. *Int J Mol Med*, 2009,23(2):279-284.
- [33] Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions[J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2010, 2(1): a002907.

该文章于2017年1月发表于南方医科大学学报

We sincerely invite you to join us and strive to put the most appropriate talent



into the most suitable position.

**MicroPort Scientific Corporation** can trace its origin back to 1998 to a small office at ZJ Hi-Tech Park, Shanghai China where a group of dedicated individuals joined together with a common belief that advancements in medical technology could transform and enhance the patients' well-being not just in China but globally. With a large global footprint of R&D, manufacturing facilities (Shanghai; Memphis, TN in the United States; Clamart in France; Saluggia in Italy; Santo Domingo in Dominican Republic), a strong focus on technology innovation with over 3,500 patent applications, and a global workforce of near 5,000 employees, MicroPort® is committed to its vision of being a patient-oriented company capable of leading the future of minimally invasive healthcare and other emerging technologies. Through years of growth and innovation, MicroPort® has become a premier medical solution provider covering 10 major business segments, including interventional cardiology and structural heart, cardiac rhythm management and electrophysiology, orthopedics, endovascular, neurovascular and neuro science, diabetes and endocrine management, urology and women's health, general surgery, surgical robotics and artificial intelligence. With over 300 products currently approved for use in over 8,000 hospitals worldwide, MicroPort® is contributing to a better world through its life-saving medical therapies and quality-improving care devices being used in patients every 12 seconds.

**MEDICAL PRODUCT INNOVATION, INC.** is a wholly-owned subsidiary of **MicroPort Group**, registered on June, 2011 in California. MPI's main business is to provide multinational procurement, R&D information, talent training and marketing services for high-end medical device R&D and manufacturing.



**微创医疗** 我们诚邀您的加盟，期待您与微创共辉煌！

微创®起源于1998年成立的**上海微创医疗器械(集团)有限公司**，是一家中国领先的创新型高端医疗器械集团，总部位于中国上海张江科学城(上海市浦东新区张东路1601号)，在中国上海、苏州、嘉兴、东莞，美国孟菲斯，法国巴黎近郊，意大利米兰近郊和多米尼加共和国等地均建有主要生产(研发)基地，形成了全球化的研发、生产、营销和服务网络。公司现有员工约5,000名，来自于30多个国家，其中过半数为中国员工。微创®致力于通过不断创新，为医生提供能挽救并重塑患者生命或改善其生活质量的最佳普惠医疗解决方案。微创®已上市产品约300个，覆盖心血管介入及结构性心脏病医疗、心脏节律管理及电生理医疗、骨科植入与修复、大动脉及外周血管介入、神经介入及脑科学、糖尿病及内分泌管理、泌尿及妇科疾病、外科手术、医疗机器人与人工智能等十大业务集群。微创®的产品已进入全球逾8,000家医院，覆盖亚太、欧洲和美洲等主要地区。在全球范围内，平均每12秒就有一个微创®的产品被用于救治患者生命或改善其生活品质或用于帮助其催生新的生命。其中，微创®生产的冠脉药物支架产品，自2004年上市以来持续保持国内市场占有率第一；2014年推出的全球首个药物靶向洗脱支架系统更是令微创®在冠脉支架领域完成了从追随者和并跑者到全球引领者的跨越。目前，在冠心病介入治疗、骨科关节、心律管理及大动脉介入治疗等多个分支领域，微创®的市场占有率均位居世界前五。[www.microport.com](http://www.microport.com), [xzpan@microport.com](mailto:xzpan@microport.com)

**MEDICAL PRODUCT INNOVATION, INC.** (简称: MPI) 是**微创集团公司**于2011年6月在美国加州投资注册的全资子公司。MPI业务是为高端医疗器械研发制造提供跨国采购、研发信息、人才培训和海外营销等服务。MPI地址199 Technology Dr., Suite105, Irvine, CA 92618, Tel: 949-988-3515, email: [zack@medicalproductinc.com](mailto:zack@medicalproductinc.com)



## North America Trucking And Transportation Associations

# 美國北美卡車運輸協會

美國北美卡車運輸協會是美國運輸行業里華人華僑唯一社團。它的作用主要是為在美華人運輸從業人員提供全方位服務及各種專業信息，也是一個為華人運輸從業人員提供聯誼活動的平台。華人運輸行業近十年在美國的運輸市場起到了舉足輕重的作用。受到了主流社會的廣泛重視，多次受到美國交通部部長趙小蘭的邀請和接見，為華人運輸行業爭取到了應有的權益。美國北美卡車運輸協會祝願廣大的在美湖北鄉親新春佳節愉快！身體安康！萬事順意！

美國北美卡車運輸協會  
祝賀  
中國夢. 楚鄉情  
演出圓滿成功！  
祝願華人華僑湖北鄉親  
新年快樂！狗年旺旺！



會長: Kevin 關 電話: 626-617-6663  
19295 E Walnut Dr. #N, City of Industry, CA 91748





在贵刊发刊14周年暨美国华裔教授学者协会成立20周年之际，特此投稿表示祝贺！

李銳  
2018.7.6于北京送院

## 我和辛亥革命的緣份

李锐

今年是辛亥革命一百週年,雖然我晚六年才出生,但是那個年代的昔多人物留在我的記憶中,有着解之緣,也可以說給我不少影響。這個話題要從我的父親說起。

### 一、父親與凌容眾

1922年我五歲時,父親就去世了,我繼承了他的書桌,抽屜和小櫃中有許多書籍,還有幾張照片。我印象深的除《飲冰室文集》《玉溪生(李商隱)詩集》(三種顏色字體線裝本)外,就是黃興、宋教仁、秋瑾的《榮哀錄》;一張較大的黃興照片,父親在上面寫了一句話:出師未捷身先死。還有一本很厚的大型精裝本《民國之精華》(1916年由日本北京寫真通信社出版,日人佐藤三郎編),內收民國初年參眾兩院443位國會議員的小傳,每人佔一頁,中日英三種文字,有照片;前面有孫中山、黃興等人的照片、傳略,以及日文中華民國議會史。約300字的李積芳(父名)小傳,開篇是評語:[君秉性誠厚篤實,痛惡浮華,居常以儉約自持,能耐勞苦;與人交直而不數,喜聞盡言。]後半是簡歷:[前清時,以湖北仕學館學員,由張文襄選送日本留學,畢業於經緯學校及早稻田大學政治經濟科。歸國應學部試,授法政科舉人,辛亥武昌起義,回湘任法制局參事,籌辦地方自治,旋組織湖湘法政學校,兼充公立法政各校教員。二年,被選為眾議院議員。J當年參議院議員代表地區,每省選十名;眾議院議員代表人口,80萬人口中選一名(湖南27人當選)。

關於父親去日本留學的情況,1980年出版的《黃興年譜》援引和《湖南文史資料》第十輯刊登的[凌容眾日記],有較詳細記載:1905年1月間,平江四人同長沙一批人,[於武漢會齊,93人去日本。16日乘輪離漢度過陰曆除夕,4日抵神戶,5日抵東京]。1905年2月11日記有除辦事:[早起改裝剪辮,小溪(父親號筱溪)繼之。][未初,偕小溪赴富士見樓,因開會歡迎孫逸仙也,不期而會者千餘人。警察原限准300人,繼許900人。樓中只能容千人,踵門而退者殆又數百人。……日本之白浪滔天演說云:吾傾家以謀中國之革命,不成,無以為生,為優人以求食。所以不忍餓死者,欲留一命以見支那之革命也。]當年除辮是一件大事,在留日學生中也只有少數人做到,這表示革命精神,同清廷的決絕。凌容眾和先父這兩位志同道合的朋友,一到日本,還沒有上學,就先除辮明志,這說明他們在國內早已接受了黃興、陳天華等的反清革命思想。因此,同盟會成立後就加入了,成為第一批會員。(頭兩年在東京參加同盟會的863人中,湖南籍最多,有157人)他們的生年都差不多:黃興、凌容眾1874年(31歲),陳天華1875年(30歲),宋教仁、李積芳1882年(23歲)。父親一生重視教育,在日本安心讀書七、八年。當年留日學生萬餘人中,因多入速成科的學校,進大學而畢績業的為數較少。

1905年冬，日本政府循清廷之請，禁止中國留學生的革命活動，陳天華蹈海自殺，以絕命喚醒國人。(陳是1903年從湖南到日本留學的，著有《猛回頭》、《警世鐘》等反清革命白話文小冊了，影響較大)一批留學生被日本政府驅逐回國，其中湖南來的有凌容眾、秋瑾(她的丈夫是湖南人)等十多人。隨後大批留學生都回國了。1906年凌回到家鄉，宣傳革命，毀家興學，創辦啓明女校，第一班八個女生中，有我的母親和李六如的元配夫人鍾恒英。父親從官費中國新歌声省出錢來，幫助妻子上學。我母親可說是辛亥革命前受過現代教育、有思想的女性，父親的為人處事和他的朋友交往，童年時就常同我們三姊弟談，尤其談同黃興、宋教仁等人的友情，啟發我們如何求學做人，向父親學習。回長沙居住時，生活非常困難，當時湖南督軍兼省長趙恆惕，同吳佩孚勾結，委父親以重任，他堅辭不就，過年過節送巨款也退回去，常同母親剝寄希望於廣東出兵北伐。

## 二、我家與黃興家

辛亥革命，黃興居功至偉，是辛亥革命的元勳，被稱為「革命的實行家」，直到武昌起義，是同盟會多次起義的直接領導者，黃花崗之役負過傷。當年孫中山、黃興是並列齊名的。討袁(世凱)失敗之後，孫黃之間曾有意見不合，孫中山成立中華革命黨時，強迫入黨的人按手印，服從他的領導，黃興拒絕加入，以致國民黨當政時，曾長期[揚孫抑黃]，不宣傳黃興的革命事跡。記得十多年前在北京開黃興紀念會時(大概是因湖南黃興故居修建開放而召開的)，我將這個情況談了。父親加入同盟會後，同黃興、宋教仁等成為好朋友。母親同我說過，黃興1916年去世時，父親悲慟不已。後來同黃的大兒子黃一歐常有往來。1949年回長沙時，我去看望過一歐兄。我進米齡(88歲)時發表過「仰懷黃公」絕句兩首：

壯志未酬公不言，遺容常伴書案間。

兒時歲歲麓山頂，好友相攜謁墓前。

民主先驅世仰瞻，恨無實踐替公傳。

我心一事差堪慰，兩代知交過百年。

黃乃(原名黃一寰)是黃興的遺腹子，我的終生好友。我們在長沙著名的楚怡小學同班，都是高材生，跳過班，畢業時他第一名，我第五名。大革命時我們都是學校童子團活動的頭頭。每年春天，學校安排學生一天郊遊，總是到長沙湘江對岸的岳麓山爬山。黃興的墳墓在山頂上，我同黃乃年年必到此拜謁。他1936年到日本留學，重走父親的路，參加左派留日學生的活動，1937年6月被日本警署拘捕，由父親的日本好友營救出獄。1938年他就到了延安，毛澤東還接見過他。我是1939年底到延安的，當晚看《日出》預演，在禮堂門口碰見了

他，真是喜出望外。在延安六年，我們無話不談，我在《解放日報》工作時，他在總政敵工部，岡野進(野阪參三)領導他頻《敵情》、《解放日報》的副刊。他會寫文章，精通日語和世界語，還會吹口琴，跳舞時參加樂隊。搶救運動中，我被關在保安處，博古並不同意逮捕我，問過黃乃對我的看法，黃認為我絕對沒有問題。他是高度近視眼，1949年後就失明了，負責盲人福利會工作，專心研究並創造新的盲文。晚年我們同住一棟樓，他的客廳中懸掛著他父親寫的兩個大字[篤實]。1988年他70歲生日時，我寫了一首七律相贈：

少小同為童子團，毗鄰共度古稀年。

六秋相飲延河水，廿載睽違凍雨天。

依舊鏡心觀世界，革新盲字吐噤篇。

常嘆大器才難展，卻有精神海內傳。

黃乃去世後，我為他的文集出版寫過一篇長文。

黃乃的大兒子偉強是油畫家，為紀念辛亥革命一百週年，他畫了當年近百人物的頭像，從加拿大回國，同百位將軍寫的字幅一起辦紀念辛亥百年的書畫展覽會。9月10日在世紀壇開幕，請我參加並講話。我講了父親同黃興、宋教仁等人的關係，他們都是追求民主和憲政的先輩，我唸了為《炎黃春秋》創刊二十週年寫的那首七律，最後高呼：辛亥革命一百年，憲政施行依舊難。

### 三、父親與宋教仁、譚延闓

父親同宋教仁的關係是非常密切的，他們同庚，在日本早稻田大學同班，宋是法律科。1987年宋教仁誕生一百零五週年時，他的家鄉湖南桃源縣政協出紀念專輯，讓我寫篇紀念文章。我在家章中談到，1900年唐才常自立軍起義失敗後，頑固派曾屠殺湖南維新人士100餘人。隨後黃興、宋教仁創建了華興會，以後和興中會、光復會合併到同盟會。1903年他在武昌讀書時，即致力組織革命團體。辛亥革命以後，成為著名的政治活動家，醉心於在中國實現議會政治，聯合幾個小黨派，改組同盟會為國民黨，以爭取國會議席的多數，成立責任內閣。孫中山就任臨時大總統後，力量太弱，迫於形勢，讓位給袁世凱。宋教仁作為追求「中華民國政權屬於人民」這一理想的代表，想利用憲法和議會去約束[獨夫當國]的袁世凱，實現中國破天荒的民主政治。宋教仁學識淵博，尤長於寫作。間島問題發生時，立即出《間島問題》一書，為清廷交涉取勝起了作用。他精心研究日本和西方的政治制度，有專門著作。他深知輿論的重要，在日本時，辦《20世紀之支那》，主持《民報》(上世紀50年代初在湖南時，父親的老朋友、原湖南高等法院院長陳長簇將他在日本收藏的全套《民報》送給

了我，1952年我[投筆從工]轉業時，將這全套《民報》送給了田家英)。隨後在上海辦《民立報》。辛亥革命前，他是黃興在國內多次起義的助手；辛亥革命後，他就成為推行民主政治。實施憲政的熱烈鼓吹者。袁世凱就任總統後，他奔走各省，協調南北，聯路政黨，全力進行競選活動，主張責任內閣制，國務總理由眾議院選出，主張省議會有立法權，省長民選。他又擅長演說，言論風采，傾動一時。國會選舉結果，參政兩院的國民黨人佔議席多數，組成國民黨一黨內閣，宋教仁為內閣總理，幾乎成為舉國定論。1913年初，他在漢口演說時有道樣的一段長話：[以前我們是革命黨，現在是革命的政黨；以前是舊的破壞時期，現在是新的建設時期；以前對於敵人，拿出鐵血精神同他們奮鬥，現在對於敵黨，是拿出政治的見解同他們奮鬥。]當時即謠傳，袁世凱要對宋下毒手，他對朋友說：暗殺之事，防不勝防，只有處之泰然，我若真被曾殺，或足以激勵同志們的奮鬥。在國會開會前夕，3月初，袁世凱急電邀宋教仁入京，「共商要政」。3月12日深夜，他由上海動身，在車站被手槍擊倒，此時黃興、廖仲愷、于右任等都在身邊。

宋教仁可說是民國主張並努力實現民主憲政的第一人。武昌起義後，《民立報》社論即指出，革命黨人中[牟私利之人多]。章太炎公開說：[革命軍起，革命尚未成功黨消]，[若舉總統，以功則黃興，以才則宋教仁]。南京政府剛成立時，由於宋同立憲派張謇、湯化龍、熊希齡有來往，深受同盟會中人的攻擊。他的[調和南北，只希望有一個和平統一的中國]的思想，不為同盟會部份人的認可。宋教仁之死，全國嘩然，這一事件縮短了袁獨世凱的政治生命。我在紀念文章結尾寫了首七絕：

獨夫子彈震神州，慟哭人才第一流。

誰道英雄長寂寞，民權社會共千秋。

宋教仁被害之後，父親懷看深切的悲慟，到北京出席國會，在國會中為宋教仁的理想，積極活動，在北京生活了六、七年，我們三姊弟都出生在北京。我出生後，張勳復辟，解散國會，父親就單獨一人到廣東，參加了孫中山召集的非常國會。辛亥革命前，譚延闓屬立憲派，在湖南任推行憲政的諮議局議長，同父親就有交往，這時同譚延闓(以及孫洪伊·周震麟·覃振等)過從更密了。譚延闓在廣東送我父親的四幅字條，上書蘇軾《張先詞跋》[張子野詩筆老妙]這一大段話，一直掛在家中，兒時是能背誦的。父親去世時，譚正閒居在上海，我的五叔父特帶我到上海去見過譚，行鞠躬禮後，譚摸看我的頭，問候我的母親，並贈送200元奠儀。1999年4月，到南京參加「五四」八十週年會議時，我和老伴曾特到譚延闓墓前行禮。

關於譚延闓當年的情況，我還知道這樣一件往事，毛澤東和蔡和森為赴法勤工儉學籌款，住在北京楊昌濟家時，楊讓他們去找時任北洋政府司法總長的章士釗，寫了封介紹信(稱蔡、毛為「天下之奇才」)。章就將時任廣東省政府主席的譚延闓匯來的2萬元匯單，交給了毛澤東。

母親同我談過當年在北京國會開會時，議員們意見不同，爭論激烈時，甚至摔起墨盒，後來墨盒就被釘死在桌子上了。國會舊址還在新華社總社院子內，現在沒有人關注這些議會舊事了。

#### 四、六如老伯

當年同父親關係最密切的平江同鄉除凌容眾外，還有方維夏和李六如。方比父親大三歲，參加過華興會，也是1905年到日本的，入東京農業大學,立即參加同盟會的活動。1911年回國後，從事教育,任第一師範學監，是毛澤東的教師。1925年到廣東，由李六如介紹入黨。1931年從蘇聯回國後,派到蘇區工作。1936年在湘贛邊犧牲。母親同我談過，父親去世時，方維夏曾伏棺痛哭。方的二女兒曾在蘇聯學習，與蔡暢同班。母親同方一家母女四人常有來往。現在平江縣長壽街辦有維夏中學，豎有方的銅像，我題寫的校名。

李六如的原配夫人鍾桓英，同母親是好朋友。母親同我說過1920年前後在長沙從事革命活動時，毛澤東常到李家,毛不講衛生,鐘桓英常給毛洗長褂子。李六如比我父親小五歲，1907年20歲的時候，他結識了同鄉凌容眾，從凌那裏知悉陳天華蹈海事件,並看到《民報》、《遊學譯編》《嘉定屠城紀略》等反清報刊和書籍。從此，投筆從戎，1908年到武昌參加新軍，結識了同盟會會員劉復基(武昌起義三烈士之一)、詹大悲等，組織文學社，為負責人之一，從事士兵運動。武昌首義時，他被黎元洪委為第四鎮十六標標統(相當於團長)，參加了陽夏之戰。由於不滿意標統職位，又覺得自己年輕，想出洋深造，幾經請求，黎元洪終於同意，贈他3,000元出洋費，每月另撥官費80元，還補了一個[陸軍少將]頭銜。

1912年到日本後，他熱心議·政治，進了明治大學的政治經濟系,一心讀社會科學書，如《社會問題十講》、《馬克思經濟學說》等，還讀了《資本論》第二卷，受河上肇著作的影響很深。1919年10月畢業回國後，曾有過「實業救國」、「教育救國」的理想，從事過這方面的活動。1920年到長沙教書，倡導平民教育運動，成立了全省平民教育促進會，方維夏時任省教育會會長，於他許多幫助。他編輯了四本通俗的《平民讀本》，於1922年出版,宣傳馬克思的社會主義思想。四本小書曾風行一時，一連印了四版，幾萬冊。1921年李六如先入團，後入黨，還作為國民黨湖南省黨部代表赴廣州，為黨辦的湘江學校募款，從而結識譚延

閻、邵力子、覃振等人。他在譚延闓任軍長的第二軍軍校中擔任過政治部主任。第二次北伐時，他任第二軍第四師(師長為張輝瓚)的中將黨代表，方維夏為第五師(譚道源師長)的黨代表，軍黨代表是李富春。

1930年到中央蘇區，他主要負責經濟方面的工作。紅軍長征後，被留在後方辦事處，經常隨着部隊在贛南山林間轉移，經常掉隊。1935年在一次非常危急的情況下，他被認為再推下去，會白白送死當俘虜，於是項英命令他和他的夫人王美蘭離開蘇區，給了一筆路費。這筆錢在過贛江時，幾乎全部被白軍搜走，流落到吉安後被捕。由於白區報紙刊有他的照片，被捕後受過種種酷刑，他守口如瓶，終被判處極刑。他於是向當年老友、時任國民黨司法院副院長的覃振求援，覃振立即給江西省長熊式輝寫信，得以釋放。因此1937年8月就到了延安。在延安曾擔任道毛澤東辦公室秘書長，他目睹江青專橫跋扈、反覆無常，服務人員十分為難，敢怒而不敢言。為了維護毛主席的威信，他將大家長期積壓在心頭的對江青的意見，向毛主席作了一次彙報，正當他向毛主席談話之際，江青走了進來，有些話被她聽見，當即大哭大鬧。此後他就離開了這個職位。

我到延安後，立即去看望六如老伯，過去只聽到母親談及同他的親密交往，以及舉家關切之情。他突然見到這個外貌酷似乃父的故人之子，自然十分驚訝和意外高興。至今我還記那表情和滿口鄉音：[呵呀，呵呀，想不到，想不到，你的姆媽好嗎?]在延安六年中，我每年總要去看望他一兩次。延安生活苦，每去必留餐，[打牙祭]。我在《解放日報》工作時，1942年要寫紀念辛亥革命的文章，特地去找他談過他參加辛亥革命的事跡，對他的一生才有較多的了解，六如伯是我們黨有數的幾個老前輩之一，他怎樣走上革命道路及其曲折的經歷，在清末老一代的知識分子中是非常典型的。難怪他後來非寫出一部《六十年的變遷》不可。他幼年喪父，母子靠借貸維持家計。他雖然飽讀經書，獲得應縣考的資格，但兩個弟弟只能當學徒。後來這兩個弟弟和兒子，都被國民黨殺害了。

延安整風搶救運動時，除了黃乃為我作證外，六如伯也為我作了證明。「搶救」中的過左做法，他向組織提過書面意見。保安處曾派人來他調查我老家的情況，問我的父親是不是紅單殺掉的。我是在長沙讀的小學和中學，老家的男男女女、老老少少，六如伯比我熟悉得多；老家的親屬中，有人死於國民黨的屠刀，也有些婦孺死於過「左」政策。有他的心證明，這類謠傳一下澄清。其實，我到延安時寫的《自傳》，老家的要人事，是寫得清清楚楚的。奇怪的是，1959年廬山會議上我受批鬥時，康生仍在造謠，說我這個人「有殺父之仇」。後來知道，六如伯向調查者再一次闢過這個謠，並對我父親作了評價：是當年具有愛



國民主思想的開明人士，如果活下來，也會贊成共產黨革命的。

解放後，六如伯任最高人民檢察院副檢察長、黨組書記。1952年初，他回到闊別二十五年的家鄉。當時我在湖南省委工作。我的母親自己做菜，舉行家宴，請六如伯吃飯，當年平江人老紅軍陳再勵(省民政廳長)、曹瑛(長沙市委書記)和陳長簇老伯都參加了。這時我正為《毛澤東的早期革命活動》一書搜集資料，他知道我的這個計劃後，談到他在延安整風時，由於思想認識的提高，發現自己一生同中國革命歷程，竟是如此緊密相連，因此寫了《自傳》之後，就將自己各個時期的經歷和認識，寫了許多札記，這個包包在離開延安後，一直隨身帶看。這次到湖南來，也附帶收集有關資料。這就為我寫書提供了極為珍貴的第一手材料。四本《平民讀本》也是這次借給我的。50年代在北京，我整天忙於事務，看望六如伯反不如在延安的次數多了。《六十年的變遷》第一卷出版之後，他在扉頁題簽，送了一本給我，至今保存着。1959年廬山會議之後，我就再也沒有見到六如伯。1979年初回到北京，去看望黃克誠，才知道這十年中，加上六如伯，我們三個人歸「專案一辦」同一個人管。80年代初，聽說他的夫人王美蘭仍住在北池子故居，於是去看望她。二十多年睽違，彼此還能認得出來。我們談了大半個上午，才知道六如伯去世前的情況。文化大革命開始後，每從報紙或廣播中得知江青又發表講話時，六如伯就向老伴叮囑，要做好思想準備，隨時應付最壞情況的發生。1967年康生一次接見湖南造反派時說：「李六如是叛徒、反黨分子。」還補了一句，就是寫《六十年的變遷》的那個李六如。反黨分子的罪名是由於六如伯參加編寫《平江革命鬥爭史》，被推為主編。這當然就是為彭德懷翻案了。至於「叛徒」的問題，自是指1935年江西被捕之事。這件事，過去六如伯沒有詳細同我談過，只說到是由覃振營救出獄的。1970年，83歲的六如伯和他的老伴，被流放到桂林，過着軟禁的生活。林彪摔死後，1972年返京，長期生病得不到正常的醫療，終於日漸惡化，只好回家待斃。最後病危時，夫人到附近借一輛三輪車，將老人拉到醫院。嚥氣時，六如伯拉着四十年共患難的老伴的手，用發硬的舌頭，喃喃呼喚看毛主席、周總理、老同志……神情極其淒苦，最後，流下兩行淚水而停止呼吸。時在1973年4月10日。

##### 五、我採訪林伯集和張曙時

在延安《解放日報》工作時，1942年為紀念辛亥革命，我還採訪過林伯渠和張曙時兩位老人，《林伯渠談辛亥革命》、《張曙時回憶京陵》都刊載在10月10日的報紙上。林老和張老都參加過同盟會，同林老談了四個小時。他是1904年到日本的，入弘文學院。最初受梁啟超辦的《新民族報》的影響。參加了孫中山到到日本時開的演講會後，立即加入同盟會。還

講到孫中山講演的主要內容所舉的例子,說明他為甚麼贊成民主共和,反對君主立憲:[鐵路是個好東西,但怎樣成功的呢?英國開初試用木軌,用馬拖車;後改鐵軌,仍用畜力;最後,終於蒸汽機車實驗成功了。政治的進步也與此相同,由皇帝專制,到君主立憲,終於民主共和。]他不贊成當年宋教仁、黃興只看重國會、政黨、責任內閣的政治活動,[以為法律是神聖,政黨內閣是隻鐵德,可以關住袁世凱這隻猛獸]。

張曙時辛亥前在南京法政學院讀書時,就參加了同盟會,並從事新軍活動。「那時只要能與同情革命的軍警聯絡,便是最好的革命工作,知道革命一定要靠武力才能成功。」學校教員在講堂上也公開談革命,黃花崗事變後,大罵清廷腐敗。他詳談南京和揚州等地起義的情況,以及同盟會改國民黨後,各地的分部都極其鬆懈,甚麼人都拉進來。

## 六、母親對我的影響

父親當年的朋友,同辛亥革命有關係的人很多,母親也很熟悉,她非常敬重這些朋友,同她敬重父親分不開。父親去世後,母親32歲,立下決心:繼承夫志,將三個子女教育成有用的人,雖然生活困難,決不能回老家吃租穀,讓兒女成為遊手好閒的子弟。母親常對我們講起與父親有關的往事,教育我們如何求學做人,特別不要趨炎附勢,品德最為重要,剷過做大丈夫的古訓:立言、立功、立德和不淫、不移、不屈,雖然年幼時還不能完全領會。前面提到的《民國之精華》對父親的評價:[君秉性誠厚篤實,痛惡浮華,居常以儉約自持,能耐勞苦;與人交直而不數,喜聞蓋言。]我在母親的教導下多有繼承,一生受益頗多,也因此受到不公正的對待。每當遇到大事,我不會突破良知的底線。儘管一生處於做人與當黨員的衝突中,我寧可受罪受苦,也不達心地去做不正當之事,傷害他人。這就是我為甚麼要寫這篇回憶文章的原因。

该文曾发表于2016年《李锐期颐集》(106-120页)

## 介紹《愛的哲學》

李锐

最近南京農學院原院長高亮之又給我寄來《愛的哲學》書稿，我同他神交有年，至今無緣一面。

幾年前，原杭州市市長鍾伯熙將高亮之的《綜合哲學隨筆：一個中國科學工作者的哲學思考》（華齡出版社2005年版）一書推薦給我，讀後使我大開眼界，許多思考過的問題得到進一步的啟發。首先想到的是，我1990年寫的〈毛澤東晚年「左」的錯誤思想初探〉那篇8萬字的長文中，曾對毛的理論思想、哲學觀點包括《矛盾論》、《實踐論》作過探討，剖析過他的「鬥爭哲學」思想。「動」與「鬥」是他早年哲學思想的一個核心觀念，既是宇宙觀也是人生觀；終其一生，好動喜鬥，尤其實踐了自己「與人鬥其樂無窮」的諾言。他認為差異就是矛盾，世界無處不存在矛盾、對立，辦任何事情都要經過鬥爭，去克服其中的矛盾，從而形成一種從理論到實踐的鬥爭哲學。他認為哲學概念中「綜合」一詞，就是「不是你吃掉我，就是我吃掉你」。世界事物無處不存在變化、存在鬥爭，只有靠鬥爭才能最後解決問題。這樣把鬥爭性絕對化後，就完全忽視和排斥了同一性，只有鬥爭性了。於是，「階級鬥爭，一抓就靈」；「不鬥則修，不鬥則垮」；「鬥則進，不鬥則退」；「8億人，不鬥行嗎」。老哲學家楊獻珍因主張辯證法還應當講「合二而一」，大挨康生、陳伯達等人的批鬥下放。當年在「鬥爭哲學」思潮的統治下，不僅從歷次政治運動發展到文化大革命，我們的哲學教科書也幾乎看不到作為馬克思主義哲學的另一個重要範疇「多樣的統一」了。

高亮之是有卓越貢獻的農業氣象專家，有深厚的自然科學基礎。他從江蘇農科院院長崗位上退下來後，以一種高度的歷史責任感，潛心研究哲學，讀了上百部古今中外的哲學名著。他發現，不論古代還是現代，東方還是西方，馬克思主義還是非馬克思主義，所有的哲學都有合理的部份，它們之間並非是互相排斥的關係，甚至可以有機地結合。他這本書的基本思想是：在當代中國，應促進「中·西·馬」哲學的大綜合。唐、宋兩代，曾有過「儒、釋、道」的大綜合，推動了中國文化的輝煌。「中、西、馬」的大綜合，應該能推動中華民族在當代的振興。當然，其中最重要的，是要認真吸收西方哲學中的自由、民主、法治、科學等積極因素。

我深深感到，不熟知自然科學，也難弄通社會科學；對人類歷史發展的普遍規律，我們信仰的主義和理論，以及黨本身的經驗和怎樣執政，都應有全面的反思。

高亮之1999年70歲離休後，除了寫出《綜合哲學隨筆》這本書外，還寫了《漫遊西方哲

學》、《淺談中國哲學》，以《綜合哲學隨筆》影響最大。我向他要了十本，分別送給中央領導同志。後來我還為《綜合哲學隨筆》的再版型寫了序言。

《愛的哲學》是《綜合哲學隨筆》的姊妹篇。直到現在，黨和國家都以馬克思主義為指導思想。而馬克思主義對於愛是持批判態度的，認為「愛」只是資產階級的「人性」，對於階級鬥爭只有消極作用。在毛澤東的「以階級鬥爭為綱」的「鬥爭哲學」中，更沒有愛的位置。1949年以來的一系列殘酷無情的政治運動，以至瘋狂的十年文革，提倡「六親不認」，將所有人類之愛(慈愛、孝愛、恩愛、情愛、師愛、友愛等)踐踏殆盡。毛澤東說過:中國不怕核戰爭，準備死3億人!儘管中共十一屆三中全會以來，對黨的歷史進行了反思，放棄了「以階級鬥爭為綱」這一提法，如中共十一屆六中全會通過的《關於建國以來黨的若干歷史問題的決議》(1981年6月27日)說:「十一屆三中全會……果斷地停止使用下以階級鬥爭為綱這個不適用於社會主義社會的口號，做出了把工作重點轉移到社會主義現代化建設上來的戰略決策。但是，在實踐中卻往往重複過去的錯誤，「鬥爭哲學」的陰影並沒有完全清除。上世紀80年代，周揚·王若水等提倡以人類之愛為基礎的人道主義，遭到胡喬木的狠批。當前，各地政府強徵農民土地，強拆居民房屋，有的官員甚至說:[沒有強拆，就沒有新中國!]各地攔截上訪群眾,甚至送入精神病院;從上到下，大小官員的腐敗，已成普遍現象。

至今，人權、自由、民主、平等、法治、公正、正義、博愛等普世價值，還有人不予承認。我的理解，這些普世價值都是立足於人類之愛。普世價值有利於人類和人民大眾的根本幸福，普世價值與人類之愛有密切的內在聯繫。

高亮之研讀了200多部古今中外的名著，著就《愛的哲學》，認真探討人類的本質，探討人的天性，探討愛與真、善、美的關係，探討愛在哲學中應有的位置。他認為，真、善、美是人類所追求的三個最高理想，愛也應列入人類的最高理想，伯拉圖在《會飲篇》中，對愛有極高的評價:愛是人類一切最高幸福的源泉。但是，愛與真、善、美相比，有它獨特的性質。真、善、美三者主要存在於客觀世界，同時也要與主觀認識相結合。「真」是人的認識與客觀事物規律的符合;「善」在客觀上要符合社會利益，在主觀上要使人滿意;「美」在客觀上有勻稱、鮮明、活潑等特性，主觀上要使人愉快。符合真、善、美的事物，主要存在於客觀世界，它們本身，並不是人的一種感情。 $1+1=2$ ，這是一個符合「真」的數學法則，但是它本身並不含有人的感情。而愛不同，愛主要並不來自於客觀世界，而是來自於人的內心，或者說來自於人的感情。對於不真的事物，人是可以愛的。例如上帝，從自然科學來說，並不是「真」的。但是基督教信徒完全可以愛上帝。對於做了不善之事的人，人也可以

愛。例如你的孩子說了一次謊話，你完全可以原諒他，教育他，決不會影響你對他的愛。對於不美的人或事物，你可以愛。例如你的母親可能長得比較醜，但是不會影響你對她的愛。愛或不愛，並不決定於外部世界的特性，而是決定於你的內心，或你的感情。費爾巴哈說：理性、意志和情感(愛)是人的本質。他是將愛和感情看成同一件事。應該說，感情與愛的含義還是有一定區別的。感情中也包括仇恨、厭惡、嫉妒等負面的感情；而愛是一種正面感情，並且是最重要的正面感情。愛也不僅是感情，而是感情與理智的綜合。人的感情有許多種。有些感情，不一定帶有利智，例如喜悅，人見到一朵美麗的花卉，或聽到早晨的鳥鳴聲，會感到喜悅，這裏並不要求有利智。又如厭惡，人見到一堆糞便，或聽到煩人的噪音，會感到厭惡，這裏也並不要求有利智。愛，就是一種含有理智的感情。這是愛的非常重要的特徵。夫妻之間的愛是人一生中最重要的愛。夫妻會共同生活幾十年，長時期的共同生活中，不可能沒有矛盾，不可能沒有不同意見的爭執，不可能沒有不同性格的衝突。但是，夫妻雙方的理智會告訴他們，所有這些矛盾、爭執和衝突，都只能以相互的寬容、相互的讓步來對待，以維護夫妻之間的長遠的愛。因此，夫妻之間的愛就是含有理智的愛。事實上，所有的愛，都是含有理智的。

書中談人類愛的對象十分廣泛，有自我、子女、父母、情侶、配偶、同胞、大眾、家鄉、祖國、藝術、科學、事業、自由、自然、人類等等。上述愛的含義中，最後提到生命力。怎樣理解生命力呢？宇宙間物質的運動是由四種力推動的，引力、電磁力、強相互作用力、弱相互作用力。這是指的無生命世界。在生命世界中，各種生物的活動也是力所推動的，這種推動生命活動的力，可以稱為生命力。生命力的根本來源是太陽能(屬於電磁力)，太陽能通過植物的光合作用，轉化為植物和動物的化學能。對人類來說，人的各種本能性的慾望都會產生生命力，生命力驅動着人做出努力，去實現慾望。愛是一種生命力，這是愛的又一個重要特徵。這個特徵使它和真、善、美相區別。真、善、美，雖然是人類崇高的理想，但它們本身並不是人內在的生命力。而人對真、善、美的愛，就是一種生命力；這種生命力可以推動人類建行不懈的努力，去追求或實現真、善、美。前面提到，愛要對所愛對象進行愛護、幫助、照顧、奉獻，這些都是要付出體力和心力的，是要付之於行動的。如果愛不是生命力，是做不到的。人的生命力有許多種。例如人有維持體溫的生命力，有維持心跳的生命力，有走路或運動的生命力，有覓取食物的生命力，有追求並滿足性慾的生命力等。但是愛這種生命力最有創造性。創造性是要創造出世界上原來沒有的事物。人的生命力只有愛才有這種能力。例如將一個受精卵培育成為一個新生命，一個新的人，那就要依靠母愛、父愛、

醫生護士的愛、老師的愛、社會的愛。書中找到，人類的一切文化、科學和藝術(文學、音樂、美術、戲劇、建築等)，都是由哲學家、畫家、導演、演員、建築師對自己專業的熱愛所創造。柏拉圖說愛的力量是偉大的、神奇的、無所不包的。就是指愛的無窮而偉大的創造力。

十年前，建黨八十週年之際，我寫了〈做人與當黨員〉一文，從自己一生三次同黨發生矛盾衝突中寫起。做人與做黨員應當是統一的，響當當做人，響當當做黨員。可是，兩者卻發生矛盾。我這樣寫出來是提出一個問題：我們總是強詢黨性高於一切是值得研究的。這來源於階級性和階級鬥爭，即過去所謂社會主義同資本主義兩條道路的決戰，勝負攸關，你死我活。從而「黨員切服從黨」，「要做黨的馴服工具」，「黨指到哪裏打到哪裏」。可是，一方面，黨是歷史時代的產物，不能離助人類歷史發展尤其是近現代歷史發展的基本規律。我認為自由、民主、科學、法治和市場經濟，過去是、現在是、將來也是(市場經濟如何變化還說不清楚)推動社會合理前進的動力；人類已進入知識經濟和信息時代，社會關係和國家關係起了很大變化，還將繼續朝和平與發展的道路變化下去。因此，黨離不開這個潮流，必須代表這個潮流，領導這個潮流。另一方面，黨是由人組成的，人是一個非常複雜的東西，他受社會環境尤其是學校、家庭、親屬、朋友、上下級的影響，也受書本、傳媒和個人性格等等影響，處在不斷變動之中。恩格斯說過，任何人要受三種限制：歷史時代，個人知識經驗，思維能力。我認為還應當加上一條：人的良知即品德。這就是說任何人都免不了要犯錯誤，從而黨也會犯錯誤。20世紀社會主義歷史告訴我們，第三國際的黨無不由領袖當家，斯大林更做到極致，毛澤東是君師合一，全國人民曾長期高唱「他是大救星」「大海航行靠舵手」；他做到了「順我者昌，逆我者亡」。毛澤東不去世，他的二十年「左」的錯誤也無法做結論，也不可能糾正。過去我們只有黨和黨性，一切有關「人」的意義都是談不得的，都是有違階級性和黨性的，如人性、人權、人道、人格、人情等等，都屬於資產階級的東西。甚至在毛澤東的教育下，親情、愛情都成為階級鬥爭的工具。我的前妻范元甄就是一個典型，延安整風時，我因被懷疑關入保安處，她與我劃清界限，並離婚；反右傾時，她不僅與我劃清界限，還寫了兩大本揭發材料，和我斷絕夫妻關係，試圖從精神上徹底摧毀我。因此，1959年廬山會議形成的「反黨集團」只有我被開除黨籍。階級鬥爭實際成為製造仇恨的學問。現在情況比過去好多了，尤其接受了市場經濟，這是一大進步(原以為是資產階級的東西)：提出了科教興國，依法治國。從而國家和社會·個人有了生氣，經濟在向前發展。可是關於

人的問題，關於人的本質是追求自由的問題(精神自由與物質自由，這是馬克思主義也追

求的基本原理)。黨性、人性、科學性、民主自由性(民主與自由分不開，是一封孿生子)是一個統一的整體，不能互相對立。以及關於治黨治國要依靠民主、科學與法治的問題，這些最為根本的理論與實踐，我們還遠遠沒有弄清而至解決，還沒有從毛澤東的陰影(專斷獨行，要一點個人崇拜)中完全解放出來。

高亮之從小愛而論及大愛，即人類之愛，或曰博愛。盧梭提出「每個人都生而自由、平等」。這句話的意思，被寫進1776年的美國獨立宣言與1789年的法國人權宣言。當前，平等與自由，已經作為普世價值，為全世界各國所承認。這一句話，在人類歷史上，應該說有劃時代的意義。然而，在西方與中國的歷史上，事實上並不是每個人生而自由、平等的。相反，人自出生以來，並不是平等、自由的。那麼，為甚麼這句話得到世界各國人民的贊同呢？因為它是符合真理的，是符合人類的本性的。盧梭提出「要找出一種結合的形式，使它能以全部共同力量來衛護和保障每個結合者的人身和財產，並且由於這一結合而使得每一個與全體相聯合的個人只不過是在服從其本人，並且仍然像以往一樣地自由。這就是社會契約所要解決的根本問題。這就是「主權在民」的思想。而「民主」的意義，就是「主權在民」。法國《人權宣言》第三條：「整個主權的本原，主要是寄託於國民。」美國《獨立宣言》中說：「政府之正當權力，是經被治理者的同意而產生的。」中華人民共和國2004年修改的憲法中說：「中華人民共和國的一切權力屬於人民。」這些莊嚴的語句，都體現着「主權在民」的民主思想。關於「法治」，英國哲學家洛克是法治思想的奠基人。洛克認為，法治的目的在于指導並保護每個人的自由和權益。歸根到底，這些先驅者認為，為了愛護人類的利益、愛護每個人的利益，必須有民主與法治。民主與法治是人類愛的必然要求。自由、民主、平等、法治、公平、正義等現代世界普遍承認的政治原則或普世價值，全部都立足於人類之愛。任何國家的政府或政治領導人，如果是熱愛人民大眾的，而不是維護少數特權者利益的，都必然會承認、接受並積極推行這些世界所公認的政治原則，或普世價值。

我們現在上上下下還有一些人喜歡用階級鬥爭的傳統觀念看問題，給普世價值貼上資產階級的標籤，以否定普世價值的存在。今年是中國共產黨成立九十週年，希望大家對社會進步的根本規律和主義、理法等問題有一個與時俱進的認識。

高亮之的《我的哲學》洋洋30餘萬字，論及愛與個人、家庭、社會、人類、自然等方方面面的關係，我感到這些問題，雖然偏於理論，卻對我們認識世界與中國的問題具有非常重要的現實意義。我希望此書稿能盡快出版，能對正確認識問題、反思歷史起作用。

该文曾发表于2016年《李锐时期集》(121-129页)

# 中国文化在产品营销价值塑造方面的实践与探索

王慧琴

## 目录:

- 一、产品是以消费者感知的价值来决定的
  - 1、传统理论中的产品定义无法涵盖“产品价值”
  - 2、以消费者感知判定产品价值
- 二、消费者如何感知价值？
- 三、中国文化对产品价值塑造方面的路径和方法
  - 1.形、神、意是触动整体感知的三大核心要素
  - 2、从形、神、意如何与产品的营销价值产生关系？
  - 3、成功的营销品牌其实也都是契合了这种价值感知的沟通形式
- 四、如何正确运用三层分析法来开展产品的价值塑造
  - 1、跳出舒适熟悉的情景，在不熟悉中发现消费者情景，并给予有效关注和解决
  - 2、对消费者的关注不要停留在数据，而要关注故事和情景
  - 3、走出网络世界，让自己和现实社会的人与情景互融
- 五、小结



## 摘要:

价值营销(Value Marketing), 也称基于价值的营销(Value-Based Marketing)。是赋予抽象的品牌以顾客可感知的价值, 让品牌具有明确而实在的价值基础, 并把价值表达出来, 达成现实销售。持续在营销领域见长的科特勒教授提出的营销3.0版, 把营销理念提升到一个关注人类期望、价值和精神的新高度。在营销3.0时代, “消费者”被还原成“整体的人”、“丰富的人”, 而不是以前简单的“目标人群”, “交换”与“交易”被提升成“互动”与“共鸣”, 营销的价值主张从“功能与情感的差异化”被深化至“精神与价值观的相应”。这一切的还原、提升乃至深化背后折射出人类社会在新社会与科技浪潮下, 出现的迈向平等、共赢与消费者参与方面较之以往所表现出的伟大飞跃。在这种背景下, 企业的营销使命也需要将营销的中心转移到如何与消费者积极互动、尊重消费者作为“主体”的价值观, 识别与满足他们最深层次的理念、价值观, 让消费者更多地参与营销价值的创造。

中国在悠久的历史长河中, 历经几千年的沧桑变迁, 也沉淀了其特有的文化特性和价值观感受体系。本文从中国文化、尤其是文字形成开始的文化特征, 和其价值观的核心感受系统入手, 分析受其濡养的现代中国消费人群对于产品营销价值感受中的心理感受逻辑, 并通过笔者实践过程中的验证经验和结果, 阐述中国文化对于产品营销价值中的作用。从另一个角度理解中国文化在新历史发展阶段的以启发

**关键词:**价值营销, 文化, 东方文化, 产品, 形、神、意;

## 正文

### 一、产品是以消费者感知的价值来决定的

#### 1.传统理论中的产品定义无法涵盖“产品价值”

关于什么是产品这个问题, 自19世纪末到20世纪初, 工业革命所推动的世界经济发展开始启蒙的市场营销理论中, 产品的特点是以“有形物品”来定义的。到了20世纪80年代, 产品理念已经被理解为不仅指满足需求的有形产品还包括无形产品以及它们的混合。这一阶段产品理念的代表人物是美国著名营销学教授西奥多·莱维特(Theodore Levitt), 他在发表于《哈佛商业评论》(1980年第1-2期)上的文章中说道:“产品有有形和无形之分, 当然通常是两者兼而有之。”所增加的无形产品就是我们通常所说的服务。西奥多·莱维特还进一步把产品细分为基本产品、期望产品、扩充产品和可能产品四个层次。后来人们在此基础上增加了“潜在产品层”, 将企业所提供的能满足顾客潜在需求的增值服务成为产品的又一个层面。

作为企业和消费者联接的载体，产品是从企业的设计制造到消费者感知、购买和使用之间，才是一个完整的循环。因此，从这个角度而看，无论怎样划分产品的层面，产品的归属仍然是无归属的、孤立的“物品”。

## 2.以消费者感知判定产品价值

在我们的生活中，随处可见这样的例子：烧烤的羊牛肉散发出阵阵香味时，我们会因嗅觉吸引步入店内，然后我们被店内带有历史感的环境和逗引视觉的画面所俘虏，在曼妙的音乐声中，我们请服务员递上红酒，美酒香肉中，我们感知着美好快乐的幸福生活。

在这个时刻，餐厅出品的烤肉只是制造环节，因为有了音乐、画面等令消费者触景生情的感受，就有了消费者对于制品的接收、接受，然后就有了品鉴的愉悦，以及因此而带给他除了直观产品之外的想象。最后这一切才完成了产品价值的打造。这种打造都源于一个相同的本质，即感知！是一切与人的感知世界密切相关的一切，包括气味、画面、音乐、服务等。这种感知不单是表层的意识，它还包括对深层次意识系统的激发和唤醒，直接带入了记忆、情感，以及想象等深层次的感知。

我们发现，在整个过程中，同样的一个产品因为面对了不同的消费者，呈现出不同的感知价值。因此，我们可以这样理解并定义产品：产品是人们在实现需求的过程中，与实现需求相关的全部感知事物及意象的集合。

“全部感知事物”是指在时间和空间两个维度上的全部感知。是过程中所有经历过的时间点及其相应空间点上的全部感知事物的集合。因为人的感知受注意的选择性倾向影响，全部感知事物实际上只是人们注意力聚焦的部分，这部分往往与人们的需求密切相关。这也暗示了产品会因不同人的注意点的不同而不同。凡是人们在实现需求的过程中，能够感知到的事物才可能构成产品；凡是感知不到的事物，就不可能构成产品。

感知具有指向性，全部感知事物就是我们感知的对象，就是我们所说的产品。这个感知指向的事物，在不同的感知者那里并不完全相同，感知指向的事物并不是我们常常理解的那个独立于人的事物，而是加入了人们自上而下的经验、知识、动机等因素的事物。

感知的全部自我活动，是人们感知的为了实现需求而做出的自我活动。

比如，顾客拿一瓶红葡萄酒招待客人、顾客拿一瓶红葡萄酒出去和家人野餐以及顾客拿一瓶红葡萄酒作为礼物送给朋友，这三种情况对应着三种不同的场景，也分别属于三种不同的产品，而不能因为都有红葡萄酒就认为是同一产品。

在产品价值感知理念中，产品属于需求人，是需求人感知的事物。供方呈给的事物并不

一定全部被需求人所感知，而供方传统上可能并不认为是产品的东西（比如一些不经意的行为、无形的香味等），却可能被需求人所感知和注重，并成为产品的重要部分。制品属于供方，是供方的东西；产品属于需求人，是需求人的东西。如果仅从供方的角度来看该事物，它就是制品而已。供方需要在生产制品的过程中，以需求人的角度来打造制品，制品才可能转换为需求人眼中“有价值”的产品。供方的任务只能做到把制品呈给需求人，最终决定产品的是需求人感知到的部分以及需求人参与的自我活动等。

人们在实现需求的过程中，感知到的制品部分才属于产品的组成部分。制品虽然呈给了，但其没有被需求人感知到的部分就不属于产品的组成部分。所以，制品属于生产企业而不属于需求人，企业生产（提供）的都是制品而不是产品；而产品属于需求人，产品是需求人感知的事物和意象。

产品是顾客价值呈给的载体或途径，实现同样的顾客价值可以有多种产品形式和途径。由于人性具有对顾客价值在量度上永无止境的追求，这种追求就成了产品不断更新换代的根本动力和终极原因。

## 二、消费者如何感知价值？

注重消费者，以消费者的价值感受来判定价值，这已经被共识。营销专家科特勒教授在将营销的三个阶段演进过程也是以类产品与消费者之间的感知距离作为了参照标准：营销1.0时代，即“以产品为中心的时代”，这个时代营销被认为是一种纯粹的销售，一种关于说服的艺术；第二个阶段是营销2.0时代，即“以消费者为中心的时代”，企业追求与顾客建立紧密联系，不但继续提供产品使用功能，更要为消费者提供情感价值，因此公司与产品都追求独特的市场定位，以期望为消费者带来独一无二的价值组合；现在被认为是营销3.0时代，即“人文中心主义的时代”，在这个新的时代中，营销者不再仅仅把顾客视为消费的人，而是把他们看做具有独立思想、心灵和精神的完整的人类个体，企业的盈利能力和它的企业责任感息息相关。

这一理论的背景也正是营销工作者们在面对新消费者时代遇到困惑中得到的答案。因为人们发现，“在大数据革命时代，企业能以前所未有的速度收集到各种海量的顾客信息，并进行复杂分析。但结果却事与愿违，因为数据摄取的方向通常是关联性，但关联性并不等于因果关系。”【摘自《洞悉客户的“待办任务”》《Know your customers”“Job to be done”》】Clayton M.Christensen ;TaddyHall;etc(Harvard Business Review 2016年9月)这种关联性将企业引入了误区。研究者发现，成功的营销人员能从顾客生活中识别出企业应提供、但未提供的，

表现不佳的“任务”。企业需要最这些待办任务开展产品设计、体验和流程。

研究者还举出了这样的餐桌这样一个例子。对于许多产品提供者所认为的，餐桌只是进餐的家具而已，而消费者则会因为和家人一起在餐桌旁度过的快乐时光，如生日、假期、圣诞等场景的记忆，餐桌成为了“家”的代表。也因此，是否愿意搬家未必是新建筑提供的特色不够，而是主人有着如果放弃那些有着深远意义的物品所带来的焦虑。

当洞察到消费者这样的价值感知后，提供者即可围绕这个价值需求，开展产品的转换，如特别调整新房子内的空间布局，特别留出契合之前餐桌的空间和位置。甚至特别提供了物品储存服务，为搬迁者将尚不确定丢弃的物件暂时储存，留待另外的时间分检再处理等等。

以消费者的感知判定产品价值这一观点已经被越来越多的市场工作者所接受和认同。但是，怎样才可以挖掘价值因素，发现客户的价值需求呢？

贝恩消费者洞察全球主管Eric Almquist和他的伙伴找出了30种价值要素，即最基础、离散的基本特征。这些要素被归为四类：职能类，情感类、改变生活类和社会影响类。其中，

职能类：省时、简单化、赚钱、降低风险、组织、整合、联系、省力、避免麻烦、降低成本、质量、多样化、感官吸引力、提供信息；

情感类：减轻焦虑、给我奖赏、怀旧、设计/审美、标志价值、健康、安抚价值、乐趣/消遣、吸引力、提供途径

改变生活类：改变生活且带来希望、自我实现、动力、财富传承、附属/从属

社会影响类：自我超越

这些要素将围绕消费者价值，以最优的方式进行组合，来增强客户忠诚度，促进业绩增长。在所有的价值感知要素中，质量感知对顾客而言是影响最大的要素。如果产品和服务不能在一个基础水准之上，其他要素的成绩都无法弥补其不足。

这个分析价值严肃的方法引用了需求层次理论，但不再是针对人类，而是聚焦消费者。这个研究表的确为企业在设计产品价值时提供了有效的参考。

然而，在面对消费者每一天无穷尽的变化，分析所列举的要素是否真的就完成了要素的项目呢？有无从其他角度的理解来挖掘消费者价值的方法呢？

### 三、中国文化对产品价值塑造方面的路径和方法

强调以人为本的“人文”精神早于几千年前中国经典书籍《周易》中已有阐述：“刚柔交错，天文也。文明以止，人文也。观乎天文，以察时变；观乎人文，以化成天下。”

意思是，世界万物的规律，有钢有柔。通过人类的智慧来约束，是人的价值。通过观察

天道运行规律，以认知时节的变化。通过人文的伦理道德，才能天地成为一体的运行。强调人是价值的核心。中国文化博大精深，中国传统文化对世界文明发展具有重要贡献，是世界文化不可或缺的重要一极，也是世界文化中最具包容性、最有生命力的文化。本文仅通过中国文化的文字、书画文化中的“形、神、意”的三个判别方式的理解，以及这三者对于人文价值感知层次的应用价值，结合本人在实际营销工作中的实际案例来展开关于消费者价值感知方面的应用实践。

### 1.形、神、意是触动人整体感知的三大核心要素

讲“感知”，包括的是“感”和“知”。感是指“五感”，即：形、声、闻、味、触；对应的是视觉、听觉、嗅觉、味觉、触觉。知是知道、明白，是感之后的意识形态的反应，是对深层次的意识系统，包括记忆、情绪、想象等的激发。这种激发所呈现的综合信息在面对特定的物理产品中，会以“神”、“意”的承载表达呈现出不同的价值感受。

在中国文化中，形、神、意是看待一个物体或一件事的整体思考结构的要素构成。

形就是形态，食物应有的表象特征，是可以看得见、摸得着的物体。是一个产品的物理属性。

神指神韵。就是透过物体的表征，进而进入情感关联的一切认知，是大脑意识层次对于物体深层次所赋予的文化、背景、象征等给予的综合感受。

意则是讲意境。就是感受者经过对产品认识、深度理解后，将之融入自己的生活场景中的一种情景想象。之所以用“意境”而不是“情景”，是因为，在这个阶段，感受者是通过想象来构建的一个场景，是虚拟但是即将可能发生的，并不是已经成为真实的状态情景。不同的人看到同一个现场却有着不同的理解和感受，通常就是在这个层次出现了差异。

比如，一座山就有着三个层次的看待。第一层是“看山是山”，在这个层次里，你只看到了山的“形”、即形态；第二个层次是“看山不是山”，这个层次需要的是你透过山的形去感受山的气势、山的雄伟等等，这些是山的“神”，即神韵；第三个层次是“看山还是山”，这时，这山已经不仅仅是“山”，而是山带给人的更深邃的意境，即“意”。如，山的胸怀、站在山顶一览众山小的高度和气概，以及会联想到日常生活或工作中所思所为之事是否有更好的处理等等。

在这里，你可以留意到，中国人看待一个物品（或产品）、或事情的思维逻辑方式虽然是从直观直觉入手的，这种直观直觉的方式从来就不被认为是事物的整体，这种直观感知之“形”只是基础或前提，只有在“形”的基础上，进而以“神”和“意”的延展，才是对继续但对这

个物品（或产品）、或事情做到了全面的认识。

这点可以追寻到对中国汉文字的发源及发展。

汉字有的是象形的，日月木水火手口刀等等，这个在古代中国叫作“文”，是最基本的汉字单位“初文”。是古人通过图像，直接描绘他所看到的事物。但是，这些字不够，就加上会意，就是在一些象形的文字上，加上一些标志意义的符号。比如说刀口上加上一点，就是“刃”；爪放在树上，就是“采”；牛被关在圈里面，就是“牢”。会意还是不够用，就加上声音，成为形声字，比如说江河松柏等等。基础的汉字主要是这三类，当然六书有六种，但主要的是这三类。

大家可以看到这三类，基础都是形。因此，用汉字来说话、思考、阅读、书写，就会带来很多特征，长期使用过程中，逐渐形成了“重感觉、重联想”的特点。如：古代的“人”字，一看就是人，如果这个人嘴巴朝天，就是“兄”，兄原本不是兄弟的兄，是庆祝的“祝”，人的口朝天是向天“祝”和“咒”的意思。人的嘴巴朝前，又是什么？是哈欠的“欠”。但这个嘴巴如果掉到后面呢？就是既然的“既”，这是吃完了不吃了，所以是“既”，即已经结束了的意思。

这种以“形”的感知开始，通过联想，领悟其“神”，进而以联想形成其“意”的过程，正是中国文化表现中的特别有趣的逻辑路径。

以书画为例，中国画常讲究“气韵生动”，“意在笔先”，画要优于其它，须有一分他处所无的“画意”。画家不但要把握住描绘对象的外形，更要捉住对象的精神，进而传达给观赏者。而且画家见景“生情”，把难以言表之“情”借着图像表达出来，这种寓“情”于“景”，把“景”和“情”融在一起的效果正是中国绘画所强调的“意境”。中国画家的构图必须超越一眼所看到的景象，命题构思时，往往隐入将要描绘的对象，洞悉其精华后，创出一个新境界，这就是“造境”。因此，欣赏者不能单看其“形”，领略其“神韵”，更要想象其“意境”。

因此，“形”的把握是绘画的基础，在这个基础上呈现出画家为形象所赋予的生命，才是上乘的作品。在“形”之外尚须传达出的“神”，才是绘画的精华。能够引人入胜，感悟其境，则为大家上品之作。

字与画在审美趣味上有相通之处。欣赏时你感受到的力量，字画上的形象色彩，字上的笔画交错，结合起来所显现的内在精神就是意境与神韵。我们常说“字如其人”，字能表现人，就是字的丰神像人。字的丰神，有的雄强，有的秀逸；有的端庄，有的狂放；甚至于有缺陷美，不规则，不平衡，这和画的种种意境并无差别。

这种形、神、意的逻辑思考深入到了中国文化生活的方方面面。品茶、插花等等都讲求



对应的神韵和意境。如品茶不仅仅是品茶，而是从喝茶时的直观的动作“拿起杯子喝，喝完放下杯”，去领悟人生“拿起放下”的智慧。

## 2、从形、神、意如何与产品的营销价值产生关系？

自有人类以来，精神性的需求就始终存在着。只是以往的市场经济阶段中，企业只需要顾及功能需求就完成了任务。但由于竞争的演变、供给的不均衡，企业必须更深入理解并真正关注消费者，不仅关注功能或一般的情感层面，更要关注其个人价值观整体。

盖瑞·祖卡夫（Gary Zukav）在其作品《灵魂之心》32（The Heart of the Soul）中曾指出，精神性正逐渐取代生存需要成为人类最重要的需求。诺贝尔经济学奖获得者罗伯特·威廉·福格尔（Robert William Fogel）同样指出，当伴随着这种社会变化，当今的消费者所寻找的产品和服务不但要满足自己的基本需要，他们更希望能发现一种可以触及其内心深处的体验和商业模式。也就是说，为消费者提供意义感将成为企业未来营销活动的价值主张。

营销3.0的概念由MarkPlus的咨询顾问何麻温·卡塔加雅与菲利普·科特勒和在东盟成立40周年之际推出。印度尼西亚是一个强调以人文主义精神应对多样化挑战的国家。可以说，营销3.0概念正是在东方诞生和形成的。营销3.0已经把营销理念提升到一个关注人类期望、价值和精神的新高度。在营销3.0时代，“消费者”被还原成“整体的人”、“丰富的人”，而不是以前简单的“目标人群”，“交换”与“交易”被提升成“互动”与“共鸣”，营销的价值主张从“功能与情感的差异化”被深化至“精神与价值观的相应”。

中国文化的“形、神、意”所对应的正是这个整体价值感知。让我们以米尼mini沙发品牌具体的案例来理解这个应用。

Mini在英文中时“小”“可爱”的意思。中文音译是“米尼”。在面对这个案例时，其实时矛盾的。作为母公司创建这个品牌时，考虑到相对主业，这是个小项目，所以用了mini的品牌。这的确是只从企业自身出发的考虑。面对消费者的矛盾就是，产品的特点并不“小”规格，借助“形、神、意”一体三层法，我们重新解构了这个品牌：

先理解第一层次的“形”

米尼，在以中国文字的字义拆解后重新理解。“米”有三层含义：一是度量单位，如米、厘米、毫米等；二是粮仓，中国人以有米来表示拥有富足的生活；三是表示微小，如米粒。“尼”属于宗教用字，多数指界限不清晰、模糊之意。在中国哲学中，有极致即为其反面的思维方式。因此，小到极致、界限不清晰，则为大。

作为物理特性的沙发而言，无论办公、还是家庭；无论客厅还是卧室，无论年轻人还是

老年人，无论男人还是女人……对于沙发的使用没有特别的边界。因此，我们打出了“无边界沙发生活”的广告语。

接着进入第二层次的“神”，神韵-性格

沙发只是一种用于坐卧的家具。这个物理的特性在有了“无边界生活”的延申的特性后，就拥有了深度的价值特质。因为品牌正处于中国经济发展的快速增长期，社会各界从业者大多都是自己所从事的职业与之前大学专业基本没有关系的——这是学科无边界；生机勃勃的人们无论老少都在积极地投身于自己的事业中——年龄没有边界；跨界的产业边界也带给社会更多的机会——产业无边界；等等。而且，虽然小的店面可以为合作者带来无限的财富——米尼，虽小却商机无限！

消费者发现，他们购买的不再是一个沙发，而是一种对自己目前生活的认同。

但是，这还不够。于是进入第三层次“意”——意境。

作为体现品牌理念的一款款沙发产品，在无边界生活理念下，还需要为消费者呈现出其“意境”。于是，体现意境的一款款产品都被匹配了对应的被称为“密码”的名称。听听这些名称：温情、底蕴、坦然、泰然、体贴、畅想……。我们称它“密码”，是因为这款产品已经不是产品本身，而是因循产品的物理特点、对应所针对的消费者的审美和家居生活要求，它会有一个触动心灵的“点”，这个点是内心深处里，消费者最在意的那个点。

比如连续几年畅销的“温情”，与设计师在理解消费者的价值时，我们关注到这个群体对家的温馨感时最在意的“点”。我们在与消费者进行价值沟通表达的时候，也是依据着这三个层次。

◇ 形：这款产品的别致之处，是它的靠背头枕是高低错落的。这样高低错落有致，不仅令款式更加灵动，也令空间特别丰富有层次感。

◇ 神：这款产品很能体现温馨家庭环境的生活特点。如果男主人坐在高头枕位时，坐在低靠背座位的女主人自然就靠依到男主人的肩上啦！

◇ 意：想想看，男主人工作回家，躺在贵妃位上，一手枕着头，一手放在高度恰好的扶手上，甚至都不用脱鞋，将脚直接放到这个 L型架子上，肯定身心都十分放松了。您想象一下，这时如果女主人捧上一杯热茶、坐在旁边的扶手位上，一种温馨油然而生，这样的场面不禁让我们感受到了家的温暖。

于是，在形与神的沟通中，每个个体对于温情的感受和所想象的“意境”是不同的，而这种不同是属于他自己的，非他人的。



这时，这款产品已经不再是那个产品，而是他生活场景的一部分，是令其感受温情的载体。

这样，产品就将消费者价值感知作为产品营销价值塑造的源点，也是真正理解了“人文中心主义的时代”。因此，消费者价值感知就是需要基于客户，除了顾客可以直观的（如眼观、手感等）感知，我们还需要以精神和想象的内容与产品的物理特性联结起来，并且给与恰当的表达与触动，并令顾客愿意接受、甚至参与这种内容的感受及共鸣，进而认同产品的整体价值，并以购买行动表达这种认同。

### 3、成功的营销品牌其实也都是契合了这种价值感知的沟通形式

理解消费者的三个感知层次，进而运用于企业的产品营销价值塑造，是所有营销人所追寻的。世界上诸多伟大的品牌都是全身心地理解洞察消费者的全部，形神意三层次消费者沟通的这种表达也从另外一个角度契合或解释了这些伟大品牌的成功之处。

创始于1903年，由威廉·哈雷（William Harley）和戴维森（Davidson）三兄弟在密尔沃基创建的Harley-Davidson Motor Company，这个品牌历经一个多世纪，持续能深入人心，绝不仅仅因为其摩托车的性能。从诞生之日起，哈雷传奇式的发展总是和特定的历史环境联系在一起。1905年的独立日的亮相，到第一次世界大战，为美军专门提供的军用摩托，并1918年，一战停战协议签订的第二天，盟军下士罗依·霍尔茨就是骑着一辆哈雷，第一个进入德国的领土；第二次世界大战中，继续的当仁不让的军用摩托仍然是这个品牌，哈雷摩托与美军朝夕相处，已经成为这些军人生命中挥之不去的一部分。当老兵回到祖国，再次见到熟悉的哈雷摩托，内心的激动是不难想象的。哈雷寄托了他们内心深处的爱国激情，他们也成为哈雷最忠实的支持。直至今日，每年的老兵聚集在二战纪念公园，无不骑着承载一生光辉岁月历史的哈雷摩托。哈雷以其深远的影响力为其拥护者开发了一系列摩托车服饰及多样化商品。哈雷的“MotorClothes®服饰”包括服装、鞋、服饰配件、骑行装备、个人物品、家庭用品、玩具、收藏品或特许商品之外的各种小纪念品。构建了消费者心目的哈雷情景生活。

## 四、如何正确运用三层分析法来开展产品的价值塑造

三层分析法已经被我和我的伙伴们运用到许多项目。在应用的过程中，对于第一个层次形的认知看上去比较容易共识。因为物理形态的理解是直观的、表象的。但从第二个层次开始就有了难度。那么，如何克服这种难度呢？

### 1. 跳出舒适熟悉的情景，在不熟悉中发现消费者情景，并给予有效关注和解决

引领客人进入意境的确有难度。但难度的重点不在于参与者的理解能力，而在于是否能

够跳出自己原有的框架重新站在消费者的角度去思考。我、我们和消费者最大的不同之处就在于因为以往的经历、知识、经验的不同，现在及未来生活的场景期待也是不一样的。而每一个人都会受到当下所处环境的影响。日常情境中那些看上去无足轻重的方面，会决定我们的行为，日常生活中，我们也发现，同一个群体的两个人，当面对同一个人或一个物体表现出的喜欢或厌恶都可能与前一天遇到的人或事有关。因此，在大数据背景下，我们需要关注的是情景。我们之所以经常对情境的力量无所察觉，是因为我们大多数的日常生活都发生在熟悉的环境里，而且无论从意识到身体，都不愿意接受新的变化。因为这种不熟悉一定会令我们不那么舒适和安逸。于是我们被局限在熟悉的、不变化的生活中，因此，难以觉察消费者心目中的情景。只有不熟悉的事物，才会让你震惊，提醒你自己对日常环境有多么忽视，这时，你才愿意用他人的视角看待问题，可以让你不会忽视那些微小的因素，这些因素会对你洞察并分析消费者的感知会产生巨大的影响。

有次在和一帮家长一起讨论孩子的教育问题。有位家长困惑于他已经9岁的孩子总是不够勇敢地尝试一些新的体能类项目，并为此苦恼。多次和孩子交流似乎都没有结果。我于是把家长和孩子拉在一起去交流，尝试从交流中发现问题所在。在敞开的交流环境中，孩子回忆到在5岁时，曾经因为一次玩跑行动，将妈妈买的一件很贵的新衣服弄脏了弄坏了。回到家告诉妈妈时，妈妈那天指责他不懂得珍惜，不知道妈妈养家的辛苦。自此以后，孩子就不敢轻易去运动，害怕妈妈的再次指责，最后就变得不再喜欢运动了。当这位母亲理解到这个情况后，简直觉得不可思议。她不曾想自己当时的举动竟然带来这样的后果。我后来追问这位母亲，当孩子那天弄坏衣服时，你到底该关心孩子是否摔伤了，还是衣服弄破了呢？母亲冤枉地表示一定是关心孩子的。只是习惯性地，认为孩子摔一跤没什么，但是因为那套衣服代表的是她对孩子的用心和爱，但孩子却把衣服弄破了，于是想当然地就认为是孩子不珍视她的辛苦了。

我们看到，同一个情景在两个人不同的理解和想象中，构成了不同的画面。虽然这其中涉及到沟通的方式问题，更重要的是对情景感知力。如果母亲可以多些对孩子弄脏衣服的情景深入感知，就不会出现后面几年后孩子需要重新养成运动健体的习惯了。

重新发现情境的力量，不只会让你挖掘到消费者的价值感知，更为你重新深入产品价值层次的研究带来启发。

2.对消费者的关注不要停留在数据，而要关注故事和情景

数据的收集与分析永远都是必要的。强调消费者价值感知是因为对于数据需要的有效起

点。顾客愿意为溢价产品买单，一定是深层次的意境，而容易引人入胜的应该就是有背景、有时间、有人物的故事。

“美国女孩”正是情景故事最好的演绎着。“美国女孩”从形的层面和其它没有什么区别，但是每个娃娃所标注的美国历史上不同时期和地点，还有讲述娃娃身世的书籍。这一切，使得拥有娃娃的女孩可以与她的伙伴、她的父母或祖母一起创造属于她们特有的故事，这个故事中有祖母、母亲那个时代的女孩所遇、所求、所思，而女孩在前辈的陈述中又在想象着自己的现在和未来，于是，一个跨时代的记忆就是因为这些娃娃诞生了诸多的价值感受。这些感受已经无法用数据的方式去做分析了。

同样的故事发生在一个以养生调理服务为产品提供的养身会馆里。一位从数据分析一定会持续消费的客人却购买了一些基础简单的服务项目，百思不得其解后，我们让工作人员请来这位尊贵、但目前并没有大的消费的客人。我们通过交流开始进入她的生活情境中，每天忙碌的工作，无休止的、必须等待自己给解决方案的会议，疲惫中他人觉得富人只会享受的眼光……当我们深入到这个情景中时，我们对这位顾客充满了尊敬和心疼。尊敬是她在自己的岗位上所创造出的社会价值，心疼她是因为这么繁重的工作量怎可以不被呵护并被调理？在我们表达了这种尊敬和心疼后，我们用意境法与顾客沟通，我们所为她提供的服务就是为了让她在疲惫中寻找一个充能量的空间，就好像汽车没有油的时候需要到加油站加油一般。我们的服务人员会因为为她的身体充满了能量，而为社会创造的价值中感受到自己也间接发挥了社会价值。

显然，在这位顾客以往所有的经历中，这是第一次感受到的不仅仅是优质服务的服务者，而是属于她个人的能量加油站，在这样的意境中，她不是单纯为了自己的享受，而是为了创造更大的社会价值。因为社会需要她持续保持旺盛的精力、年轻的状态。在这样的价值重新认知中，客人自然购买了体现她社会价值的服务产品，并且成为这个店消费最高的顶端VIP客人。

### 3.走出网络世界，让自己和现实社会的人与情景互融

网络世界一方面带来了诸多的便利，一方面也衍生了许多社会问题。其中，沉迷于网络的虚拟世界，与现实中人与人之间直接的沟通成为了难得的事。网络世界所构建的意境仿若真实的情景，将现实中难以实现的愿望得以实现，这也是令人迷恋的网络世界的诱惑之一。

作为市场营销的从业者，就是产品和人性之间的链接者。对人性的理解就是通过人与人之间的直接接触才能获得最直接的感知，在感知中寻求共性和个性的特点。了解人的情感及

其表达形态，丰富而细腻的内心世界，不同文化背景下的人文特征等等。从而获得最真实的、有效的、跳出自我的消费者价值感受。

亿城泉说的高端别墅项目，是个参观者众、购买者少的项目。因为项目的设计看上去并不符合目标群体所要求的学校医院配套，大门辉煌、入大门后院落开阔的期待和要求。而且，在同区域间，价格高出一倍以上。

在对这个案例进行调整时，对其形、神做了重新梳理，进而营造意的环节。

(见附表)

## 五、小结

消费者价值感知是个很大的命题。我们运用中国文化的三层价值感知方法在实践的探索中进行了探索，并取得了一定的成效。由于中国文化中的文字代表的字义、一语双关的语言特性等，导致我们还需要进一步思考其应用的广泛性。如何令非汉语国家的市场从业者也能理解，该方式如何更完善简便，也都是我们接着要持续探索的问题。

形		神	意
物理特性	基本表述	核心内涵	见识过风云，才懂得高的境界。
山顶景观	开门见山	这个群体做事属于直接、大气、效率	商界的竞争，你如鱼得水。何时进，何时退，了然在心。 资本世界的再大波澜，你都能沉着以对。 而站在156米的九连山山顶，面对着真实世界的风云变幻， 你的心被慑住了。才明白人生走得再高，也高不过这广州最高山巅别墅的“气定神闲”。 高于广州市区近千倍的负氧离子，高达10万/cm <sup>3</sup> ， 享受山巅的自然呼吸。
温泉入墅	入户泡泉	象征这个群体是能“沉得下来”：谦逊、低调	沉得下心，放得下身价。 忙不完的会议，脱身不掉的应酬， 总是感叹连松口气的时间，都那么难得。

负离子空气	畅顺呼吸	这个群体对社会环境的关注的责任感及使命感	位高权重，赢得了尊敬，也输掉了享受。 在这儿，有石门、流溪河两大国家森林公园的环抱， 有自然风景保护区的原生景趣， 更稀有的是，全球两大氡泉之一，随时享用。 再高的身价，也都容得下。
亿城的服务	全心全意	这个群体做事是忘我、投入特征	在亿城泉说， 可以安静的独处，也可以尽意的享受， 你所关心的，都已经悉心备好： 铂金五星级酒店会所， 为您提供随时所需的服务。
建筑：东方汉唐文化+现代建筑结构	中西合璧	这个群体东方文化底蕴、西方结构思维	从不盲目跟随，生活自有格调。 开放的思想格局，在中西交融的建筑精神里 汉唐建筑风格与现代简约融为一体，彰显大家风范。 传统与现代的极致演绎中，得到最好注解。 无论是注重传承的家族大户， 还是怡然自住的田园风范， 都不免成为他人的追随范本。
双龙汇水，荣脉相传	荣脉传承	寓意家族或一个品牌体系的繁荣、基地	放眼长望，开阔的不只是眼界 换个角度看问题，总有新领悟。 推开门，豁然开朗。
2公里私家路：开山炸石建路	感想敢做	企业家精神、敢为人先的精神	如一笔挥就的画卷一般展开眼前， 所有被禁锢的思想，像打开阀门似的，瞬时通畅。

山顶 建造、依 山建筑	创新突破	传承与创新： 家族兴旺之本	
发展 商的开发 理念：敬 天、尊 地、爱人 ——真正 打造“新 社区文 化”	厚德载物	这个群体无论 生活 还是企业在道德方 面的修炼	这里，没有大人物，只有球友、马友与老友 没有应酬，没有客户，没有厚厚的名片…… 在这里，大家都是邻居。
	其乐融融	开阔豁达特 质，建筑之间的关 联：邻里关系、物 业之间的关系等	一起到附近的国际高尔夫俱乐部打打球， 或者相约在亚运马术场， 有时候在回家的路上偶遇， 合作的事情，就自然而然了。

参考：

1. 王耀庭的《如何看中国画》 中信出版社ISBN： 9787508658063
2. 闵昱《商学：重新定义产品与顾客价值》 机械工业出版社 2018-05-01
3. 菲利普科特勒（美）《营销革命3.0 — 从产品到顾客再到人文精神》
4. 《洞悉客户的“待办任务”》 《Know your customers’“Job to be done”》 Clayton M.Christensen ;TaddyHall;etc(Harvard Business Review 2016年9月)

# 波形蛋白对EV71感染小鼠脑组织NLRP3炎性小体活化的影响

肖汉森

曹虹

南方医科大学公共卫生学院微生物学系, 广东 广州 510623

**Abstract: Objective** To explore whether vimentin (VIM) could mediate the activation of inflammasome in mice with EV71 infection of the central nervous system. **Methods** Thirty VIM knockout mice ( $VIM^{-/-}$ , 3 to 5 days old) and 40 wildtype mice (WT, 3 to 5 days old) were randomly divided into control group and infection group. The infection group was intraperitoneal injected with EV71 ( $10^8$ TCID<sub>50</sub>/mice), while the control group was intraperitoneal injected with PBS (10  $\mu$ L/mice). The general conditions of mice were observed each day. Western blotting, ELISA, RT-PCR were used to measure the levels of IL-1 $\beta$  and caspase-1 in brain or cerebro-spinal fluid. Furthermore, the pathological changes in the cerebella and brain were observed using immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the  $VIM^{-/-}$  mice infected with EV71 showed no significant change in NLRP3, IL-1 $\beta$  and caspase-1 expression. While the WT mice infected with EV71 showed obviously increased NLRP3, IL-1 $\beta$ , caspase-1 level in the central nervous system, Furthermore, the neurons of  $VIM^{-/-}$  mice in the infection group was damaged more minor than the same in WT mice. **Conclusion** We found that VIM could mediate the activation of inflammasome in EV71 infected central nervous system of mice as well as promote the brain inflammation and neuron damage.

**Key words:** EV71, vimentin, inflammasome, Central Nervous System

肠道病毒71型 (Enterovirus 71, EV71) 是一种嗜神经组织病毒, 它是引起婴幼儿手足口病和病毒性咽峡炎的主要病原体之一<sup>[1]</sup>。重症患儿还可出现严重的中枢神经系统疾病, 例如无菌性脑膜炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎样的麻痹等<sup>[2]</sup>, 个别重症患儿病情进展快而导致死亡。自1974年首次报道以来, EV71感染已在全球范围内引起多次流行和爆发<sup>[3]</sup>。近年来EV71病毒的流行在亚太地区呈现上升趋势, 其中最引人关注的就是其感染所引起的中枢神经系统症状<sup>[4]</sup>, 多发生于5岁以下幼儿, 1岁以下婴儿发病率最高。

近年来, 越来越多的研究表明固有免疫识别系统在机体抵御病毒感染和诱导炎症反应的

过程中起到重要作用，宿主细胞可通过特异的受体蛋白，激活细胞信号通路而诱发炎症反应<sup>[5]</sup>。NLRP3炎性小体（inflammasome）是由多种蛋白质组成的复合体，能够调节胱冬肽酶-1（caspase-1）的活化进而促进细胞因子前体pro-IL-1 $\beta$ 和pro-IL-18的切割成熟<sup>[6]</sup>，在固有免疫系统功能发挥过程中具有极其重要的作用。此外，研究还报道NLRP3炎性小体能调节caspase-1依赖的细胞焦亡（pyroptosis），诱导细胞在炎性和应激的病理条件下死亡<sup>[7]</sup>。同时，有研究发现存在于宿主细胞表面的波形蛋白（vimentin, VIM）可作为EV71的吸附受体<sup>[8-9]</sup>，而波形蛋白介导的NF- $\kappa$ B信号通路在中枢神经系统感染的过程中起重要作用<sup>[10]</sup>。近年来，Dos SG等<sup>[11]</sup>的研究证明了在鼠急性肺损伤过程中，VIM参与了炎症小体的激活。据此，我们推测在EV71感染中枢神经系统的过程中，VIM介导NLRP3炎性小体的激活，从而促进caspase-1的活化和炎症因子IL-1 $\beta$ 的释放，最终引起炎症反应导致脑组织损伤和神经元死亡。本研究拟通过EV71感染野生型小鼠（Wildtype, WT）和VIM基因敲除（VIM<sup>-/-</sup>）小鼠，比较两种小鼠脑内炎性小体效应蛋白caspase-1活化和IL-1 $\beta$ 释放的情况以及神经元受损的程度，以探究在EV71感染时，VIM是否介导了炎症小体的激活，从而引起炎症反应和中枢神经系统损伤。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 3-5日龄VIM敲除型及野生型SV129乳鼠，体重2.5-3.0g（美国南加州大学洛杉矶儿童医院黄胜和教授惠赠）。

**1.1.2 EV71病毒株** 由广州市儿童医院中心实验室经5岁重症手足口病患儿咽拭子临床分离培养，RD细胞培育保种。

**1.1.3 主要试剂** IL-1 $\beta$ ELISA试剂盒（Dldevelop公司），RIPA裂解液（北京鼎国昌盛生物公司），caspase-1一抗（武汉proteintech公司），辣根过氧化物酶标记二抗Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (北京鼎国昌盛公司)，Trizol试剂（日本宝日医生物公司），TransScript One-step逆转录试剂盒（北京全式金公司），sybr premix ex taqII荧光定量试剂盒（日本宝日医生物公司），神经元NeuN抗体（Abcam）。

荧光定量RT-PCR相关引物由上海生工公司设计合成，序列如下表：



表1 荧光定量RT-PCR相关引物序列

Tab.1 The primer sequences of fluorescence quantitative PCR

基因	正义链	反义链
Caspase-1	5'-TGCCGTGGAGAGAAACAA-3'	5'-ATGAAAAGTGAGCCCCTG-3'
IL-1 $\beta$	5'-CCTCGTGCTGTCGGACCCATA-3'	5'-CAGGCTTGTGCTCTGCTTGTG A-3'
$\beta$ -actin	5'-AGCCTTCCTTCTTGGGTATGG-3'	5'-CCTGTCAGCAATGCCTGGGTA-3'

**1.1.4 主要仪器** 台式高速离心机（美国Thermo公司），半干转Western blot 电泳仪（上海拜力生物公司），BeckmanJ2-MC高速冷冻离心机（美国Beckman公司），倒置显微镜IMI-Z（日本奥林巴斯光学工业），精密电子天平（德国Satorius公司），病理切片机（上海徠卡仪器有限公司RM2016），LightCycler96实时荧光定量PCR仪（瑞士罗氏公司）。

## 1.2 方法

**1.2.1 EV71的培养与收集** 由广州市儿童医院中心实验室工作人员选取3份阳性咽拭子标本进行筛选培养分离EV71株。咽拭子保存液标本经0.45 $\mu$ m过滤器过滤后取200  $\mu$ l过保存液接种于已长满单层RD细胞的6孔板上，并设置复孔和阴性对照孔，在二氧化碳培养箱内37 $^{\circ}$ C，不加胎牛血清的细胞培养液进行培养。每天用倒置显微镜观察有特征性的肠道病毒致细胞病变效应的出现。第一代培养的细胞及其培养液经3次反复冻存后离心，取上清作为一代培养病毒。

**1.2.2 小鼠的病毒接种** 各取出生3-5天的基因敲除型和野生型乳鼠，随机分为EV71感染组和PBS注射的对照组。感染组小鼠腹腔注射10  $\mu$ l含有 $1 \times 10^8$ TCID<sub>50</sub>的病毒液，对照组腹腔注射10  $\mu$ l无菌PBS。观察一周时间，当感染组小鼠出现毛发疏松、体重减少或肢体麻痹等症状时收集所有小鼠脑组织和脑脊液标本待用。

**1.2.3 ELISA检测小鼠脑组织和脑脊液中IL-1 $\beta$ 的变化** 将待取标本的小鼠用1%戊巴比妥钠麻醉，打开胸腔，从心脏右心室处用无菌PBS进行灌洗，冲洗血液循环系统内及脑部的血液。无菌打开小鼠颅腔，摘取脑组织，称重，并浸泡于事先冷浴的无菌PBS中。吸取脑脊液（Cerebrospinal fluid, CSF）于无菌EP管中，-80℃保存。按ELISA试剂盒（Dldevelop公司）推荐步骤进行操作，检测IL-1 $\beta$ 的表达水平。

**1.2.4 Western Blot** 取小鼠脑组织，按照蛋白提取试剂盒操作步骤提取组织蛋白，BCA法检测蛋白浓度，与5 $\times$ SDS PAGE上样缓冲液混合，100℃加热5分钟。取50  $\mu$ g蛋白样品于12% SDS-PAGE胶电泳。后电转至PVDF膜，用含5%脱脂奶粉的TBST溶液封闭一小时，一抗（1:2000）孵育，4℃过夜。PVDF膜用TBST清洗三遍，二抗（1:3000）孵育1小时，再次清洗三遍后，使用全自动化学发光成像分析系统检测蛋白条带。

**1.2.5 荧光定量PCR**按照组织总RNA提取说明书提取全RNA。经过TransScript One-step逆转录试剂盒说明书逆转录为cDNA, PCR反应式：95℃预变性10分钟；95℃15秒，60℃15秒，68℃20秒40个循环扩增；95℃10秒，65℃1分钟，97℃1秒解链；37℃30秒冷却。以 $\beta$ -actin为内参，相对表达量= $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ， $\Delta Ct$ =目的基因平均Ct值-内参照平均Ct值， $\Delta\Delta Ct$ =实验组 $\Delta Ct$ -对照组 $\Delta Ct$ 。

**1.2.6 病理组织切片** 取待检测的小鼠脑组织放入福尔马林中保存，制作前先漂洗，乙醇梯度脱水后将组织浸泡在二甲苯（xylene）中室温摇动20 min，重复3次。于包埋机器中60℃孵育45 min，重复3次。将组织放进切片模型，倒满包埋液，置于冰上使石蜡凝固，常温保存；用石蜡切片机切片，片厚为4  $\mu$ m。切片漂浮于40℃的摊片机温水上，展平。捞起漂浮于载玻片上的组织片，置于60℃烘箱内烤干。待水烤干蜡烤化后取出常温保存备用。经过细胞核、细胞质染色之后封片，在倒置显微镜下观察组织并拍下组织图片。

**1.2.7 免疫组化** 将石蜡切片脱蜡清洗，加热法进行抗原修复。室温冷却后将玻片浸泡于PBS（pH=7.4）洗涤3次，放入3%过氧化氢溶液，避光孵育25 min，将玻片再次PBS洗涤3次。滴加3% BSA，均匀覆盖组织，室温封闭30min。轻轻甩干，在切片上滴加神经元抗体，4℃孵育过夜后PBS溶液洗涤3次。后滴加二抗覆盖组织，室温孵育50 min，再次PBS洗涤3次。滴加新鲜配制的DAB显色液，显微镜下控制显色时间，阳性为棕黄色时终止显色。脱水封片，最

后用显微镜镜检，通过ImageJ软件计数分析。

**1.2.8 统计学分析** 采用SPSS 16.0统计软件,各组方差齐同后采用单因素方差分析（两组之间比较采用SNK-q检验），检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 检测EV71感染小鼠脑脊液中炎症小体的活化

感染小鼠一周，取小鼠脑脊液，经考马斯亮蓝染色考察蛋白质含量合适之后，用Western Blot与ELISA检测小鼠受感染后神经中枢系统中NLRP3及其下游炎性产物Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的生成、释放到CSF中的情况。结果显示：仅在野生小鼠感染组脑脊液内检测到NLRP3和Caspase-1，且野生小鼠感染组IL-1 $\beta$ 的含量也明显高于基因敲除小鼠感染组（\*\*\* $P<0.05$ ，如图1）

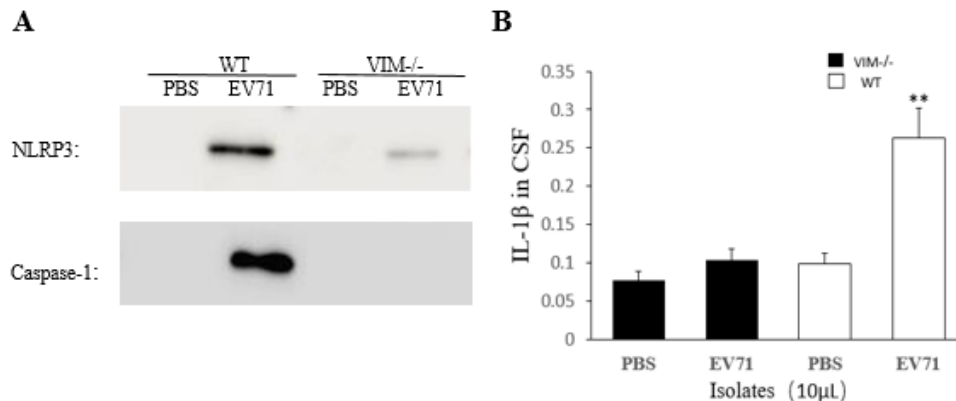


图1 各组小鼠脑脊液中NLRP3, Caspase-1和IL-1 $\beta$ 含量变化

Fig.1 Release of NLRP3, Caspase-1 and IL-1 $\beta$  in WIM<sup>-/-</sup> and WT mice of each group. A: The expression of NLRP3 and Caspase-1 in CSF of each group was detected by western blot; B: Expression of IL-1 $\beta$  in CSF of each group was detected by ELISA, and compared with the VIM<sup>-/-</sup> group, the WT infection group was obviously increased (\*\* $P<0.05$ ).

### 2.2 小鼠脑组织炎症小体下游产物Caspase-1和IL-1 $\beta$ 与VIM有关

感染小鼠一周之后，取小鼠脑组织，提取组织全蛋白质，用Western Blot技术检测Caspase-1含量；同时运用ELISA试剂盒检测脑组织内IL-1 $\beta$ 的生成，比较VIM基因敲除和野生型小鼠的Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的生成量是否不同。结果显示：VIM基因敲除小鼠EV71感染组和PBS组比较无统计学差异，野生型小鼠EV71感染组和PBS组比较，脑组织中Caspase-1和IL-1 $\beta$

含量明显升高 (\*\* $P < 0.05$ ) (图2)。

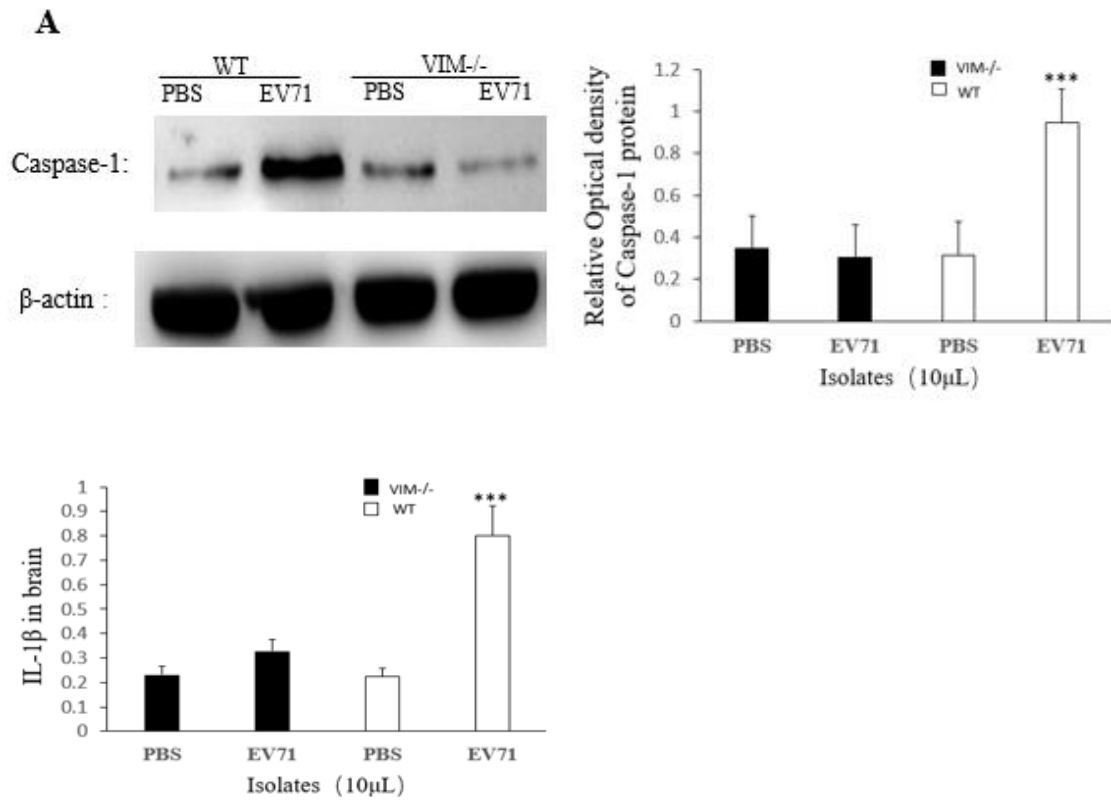


图2 各组小鼠脑组织内Caspase-1, IL-1 $\beta$ 的表达量

Fig.2 Expression of Caspase-1 and IL-1 $\beta$  in WIM<sup>-/-</sup> and WT mice of each group, compared with the VIM<sup>-/-</sup> group, the WT infection group was obviously increased (\*\* $P < 0.05$ ). A: The relative expression of Caspase-1 in brain tissues was detected by western blot; B: Expression of IL-1 $\beta$  in brain tissues of each group was detected by ELISA.

### 2.3 小鼠脑组织炎性产物mRNA的表达与VIM有关

将病毒感染一周后的小鼠以及PBS注射的对照组小鼠提取的脑组织总RNA经逆转录和RT-PCR测定发现, 相对于野生型小鼠, VIM基因敲除组的Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的mRNA含量更低 ( $P < 0.05$ ) (如图3, 表2)。

表2 小鼠脑组织炎性产物mRNA的表达与VIM有关

Tab.2 The expression of Caspase-1 and IL-1 $\beta$ is related to VIM in mice

组别	Caspase-1 mRNA	IL-1 $\beta$ mRNA
VIM <sup>-/-</sup>	1.51±0.162	1.13±0.237
WT	2.87±0.202	3.37±0.616
<i>t</i>	4.703	3.39
<i>P</i>	0.0424	0.0275

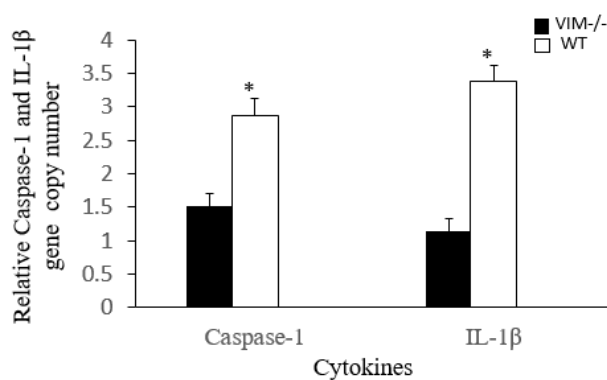


图3 各组小鼠脑组织中Caspase-1和IL-1 $\beta$ 的mRNA含量变化

Fig.3 Expression of Caspase-1 and IL-1 $\beta$  mRNA in VIM<sup>-/-</sup> and WT mice of each group was detected by RT-PCR.,the VIM<sup>-/-</sup> mice infected with EV71 showed no significant change and the WT infection group was increased(\* $P$ <0.05).

#### 2.4 VIM介导的炎症小体激活对脑组织内神经元的损伤情况

经过对小鼠体内炎症小体衍生物的检测之后，我们发现野生型小鼠经EV71感染后和其它几组小鼠存在差异，于是我们用免疫组化实验进一步考察和对比两组小鼠在感染EV71之后脑组织所受到的损伤情况。在显微镜下可见，经抗体染色后神经元细胞呈棕色，大脑皮质内野生鼠感染后神经元细胞形态皱缩，并出现大量炎性细胞浸润，空白组脑皮质内神经元细胞数量多，细胞圆润，经Image J细胞计数软件分析发现，虽然实验组小鼠均有细胞数量减少，但基因敲除实验组小鼠神经元细胞相对含量高于野生实验组 ( $p$ <0.05)，（如图4）。

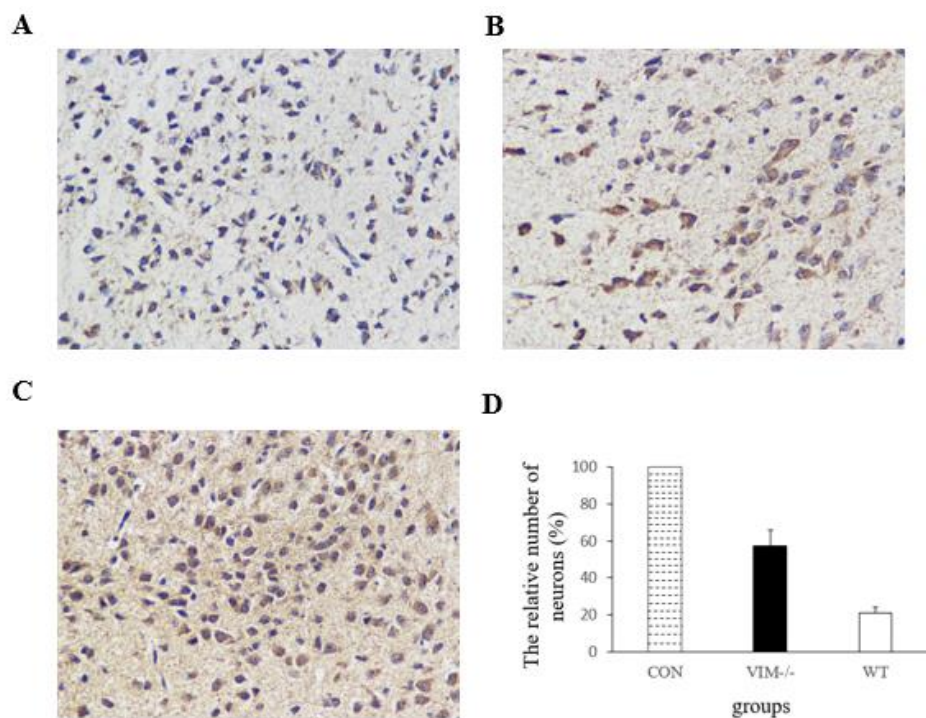


图4 感染EV71后各组小鼠大脑皮质神经元的损伤情况图

Fig.4 Vimentin-mediated the damages of mice brain infected with EV71 were evaluated by immunohistochemical staining ( $\times 400$ ). A: WT mice infected with  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> of EV71; B: VIM<sup>-/-</sup> mice infected with  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> of EV71; C: Control group of mice treated with PBS ; D: Counting the neurons in brain tissues by Image J software, the relative numbers of neurons in VIM<sup>-/-</sup> mice was more than the same in WT mice ( $p < 0.05$ ).

检测小脑皮质发现，VIM基因敲除组小鼠小脑皮质神经元细胞形态较之空白组没有太大的改变，野生组小鼠小脑皮质内有细胞皱缩变形，炎性细胞浸润等现象，而经软件计数分析，VIM基因敲除感染组小鼠神经元细胞数量与空白组无统计学差异，明显高于野生小鼠感染组 ( $P < 0.05$ )，(图5)。

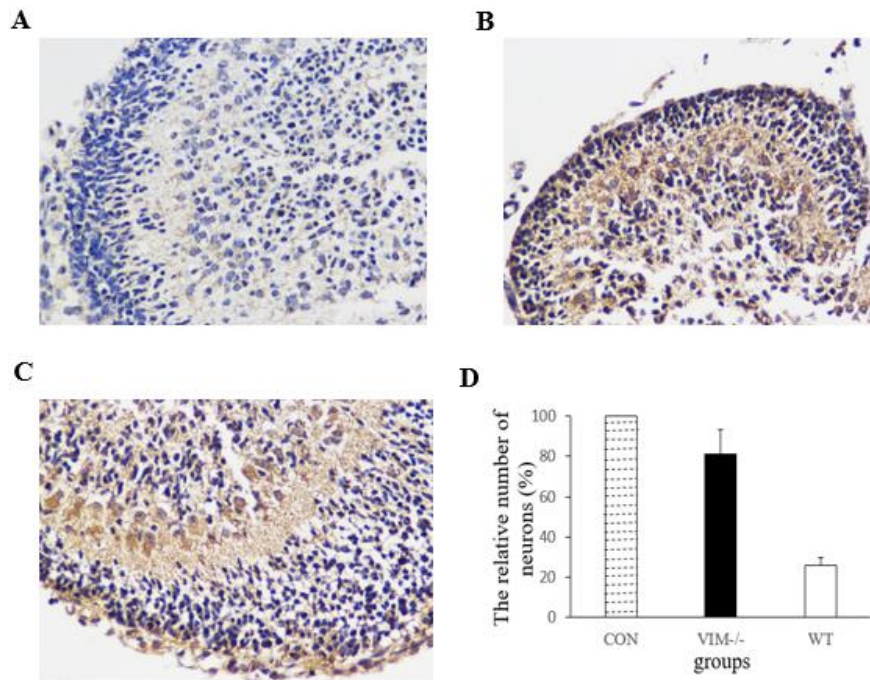


图5 感染EV71后各组小鼠小脑神经元的损伤情况图

Fig.5 Vimentin-mediated the damages of cerebellar in EV71 infection mice was evaluated by immunohistochemical staining ( $\times 400$ ). A: WT mice were infected with  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> of EV71; B: VIM<sup>-/-</sup> mice were infected with  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> of EV71; C: Control group of mice treated with PBS ;D: Counting the neurons in Cerebellum tissues by ImageJ software, the relative numbers of neurons in VIM<sup>-/-</sup> mice was more than the same in WT mice ( $p < 0.05$ ).

### 3.讨论

关于NLRP3炎症小体与中枢神经系统感损伤关系的研究日益成为医学界的热点。有学者在脑部急性严重创伤婴幼儿患者的脑脊液中检测到炎症小体的大量激活<sup>[12]</sup>。同时，体外细胞实验研究中发现，用药物刺激星形胶质瘤细胞后也有炎症小体的活化产物IL-1 $\beta$ 的增多<sup>[13-14]</sup>，证明了NLRP3炎症小体和中枢神经系统损伤的关系。最新的小鼠动物模型研究也表明，在病原体的刺激下，VIM参与介导炎症小体引起小鼠的脑炎、肺水肿等病变，同时VIM又作为一些病原体感染宿主细胞的受体蛋白，在病原体早期的结合和病毒增殖的过程中起到重要的作用<sup>[15-17]</sup>。由此我们提出假设，VIM在EV71感染中枢神经系统的过程中是否也参与了介导NLRP3炎症小体的活化。

我们的研究就是利用VIM基因敲除小鼠，比较EV71感染两种小鼠组织器官的病理改变和细胞水平炎症因子的表达，来研究VIM蛋白是否介导了炎症小体。其研究目的就是要探明

VIM介导EV71的感染与炎症小体激活的关联作用机制,从而能够为治疗EV71感染所引起中枢神经系统病变提供科学依据。

Caspase-1和IL-1 $\beta$ 是炎症小体激活后诱导生成的产物,被用来作为炎症小体激活的指示物<sup>[18]</sup>。在实验中我们发现,经腹腔注射EV71之后,从野生型小鼠的脑组织以及脑脊液内检测到比VIM基因敲除型小鼠和空白组小鼠更高的IL-1 $\beta$ 和caspase-1含量,提示在EV71侵染中枢神经系统过程中可能有炎症小体的激活,并且这个过程可能与VIM有关。我们通过免疫组化分析考察了神经系统的病理改变情况发现,伴随着炎症小体的激活,野生型小鼠神经元细胞受到破坏损伤而大量减少,提示EV71引起机体中枢神经系统损伤与炎症小体的生成有关。但是, EV71感染过程中VIM如何介导炎症小体的激活还有待进一步研究。

综上所述,本研究结果表明, EV71在侵染中枢神经系统过程中可能通过VIM介导炎症小体活化,继而促进caspase-1活化和炎症因子IL-1 $\beta$ 释放,引起炎症反应,最终导致中枢神经系统损伤和神经元死亡。因此, VIM对炎症小体的调控作用具有较高的研究价值,我们的研究为EV71引起的病毒性脑炎、脑膜炎防治开拓了新的思路并提供了新的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Ho M. Enterovirus 71: the virus, its infections and outbreaks[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2000,33(4):205-16.
- [2] McMinn PC. Enterovirus vaccines for an emerging cause of brain-stem encephalitis[J]. N Engl J Med, 2014,370(9):792-4.
- [3] McMinn P, Stratov I, Nagarajan L, et al. Neurological manifestations of enterovirus 71 infection in children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Western Australia[J]. Clin Infect Dis, 2001,32(2):236-42.
- [4] Yan JJ, Su IJ, Chen PF, et al. Complete genome analysis of enterovirus 71 isolated from an outbreak in Taiwan and rapid identification of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 by RT-PCR[J]. J Med Virol, 2001,65(2):331-9.
- [5] Li Q, Zhang X, Wang W, et al. CPT-11 activates NLRP3 inflammasome through JNK and NF-kappa B signaling[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015,289(2):133-41.
- [6] Tricarico PM, Epate A, Celsi F, et al. Alendronate treatment induces IL-1B expression and apoptosis in glioblastoma cell line[J]. Inflammopharmacology, 2017, 2017 :1-6 .
- [7] Evavold C, Kagan JC. How inflammasomes inform adaptive immunity[J]. J Mol Biol, 2017,



S0022-2836(17):30470-9 .

- [8] Du N, Cong H, Tian H, et al. Cell surface vimentin is an attachment receptor for enterovirus 71[J]. *J Virol*, 2014,88(10):5816-33.
- [9] Luo WY, Zhong JY, Wei Z, et al. Proteomic analysis of human brain microvascular endothelial cells reveal differential protein expression in response to enterovirus 71 infection[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 864169.
- [10] Chi F, Bo T, Wu C H, et al. Vimentin and PSF act in concert to regulate IbeA<sup>+</sup>*E. coli* K1 induced activation and nuclear translocation of NF-kappa B in human brain endothelial cells[J]. *PLoS One*, 2012,7(4):e35862.
- [11] Dos SG, Rogel MR, Baker MA, et al. Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Nat Commun*, 2015,6:65-74.
- [12] Wallisch JS, Simon DW, Bayir H, et al. Cerebrospinal Fluid NLRP3 is Increased After Severe Traumatic Brain Injury in Infants and Children[J]. *Neurocrit Care*, 2017,27(1):44-50.
- [13] Kinzel S and Weber MS. The Role of Peripheral CNS-Directed Antibodies in Promoting Inflammatory CNS Demyelination[J]. *Brain Sci*, 2017 ,7 (7) :70-5.
- [14] Collongues N, Michel L, de Seze J. Biotherapy in Inflammatory Diseases of the CNS: Current Knowledge and Applications[J]. *Curr Treat Options Neurol*, 2017,19(5):19-23.
- [15] Li Q, Zhang X, Wang W, et al. CPT-11 activates NLRP3 inflammasome through JNK and NF-kappa B signalings[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015,289(2):133-41.
- [16] Lee HW, Lee CG, Rhee DK, et al. Sinigrin inhibits production of inflammatory mediators by suppressing NF-kappa B/MAPK pathways or NLRP3 inflammasome activation in macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017,45:163-73.
- [17] Xiao Q, Qu Z, Zhao Y, et al. Orientin Ameliorates LPS-Induced Inflammatory Responses through the Inhibitory of the NF-kappa B Pathway and NLRP3 Inflammasome[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017,2017:2495-16.
- [18] Lee NY, Chung KS, Jin JS, et al. The Inhibitory Effect of Nodakenin on Mast-Cell-Mediated Allergic Inflammation Via Downregulation of NF-kappa B and Caspase-1 Activation[J]. *J Cell Biochem*, 2017,118(11):3993-4001.

该文章于2018年6月发表于南方医科大学学报

# **DIGITAL DIVIDES AND SOCIO-DEMOGRAPHIC FACTORS: A LONGITUDINAL**

## **QUANTITATIVE STUDY OF INTERNET USERS IN U.S. FROM 2000 TO 2010**

Peter H. Zhang, Ph.D.

### **Abstract**

This research attempted to reveal the existence of digital divides, their relationships to users' socio-demographics, and the Internet adoption and usage patterns. It was a longitudinal investigation targeted to the adults eighteen years or older in the household setting from the nation-wide surveys conducted in the United States between 2000 and 2010. Digital divides were investigated in three levels (dimensions): Internet access, usage (frequency), and scope (consequence). Six socio-demographic characteristics were investigated: gender, age, education, income, occupation, and race. This research showed that Internet access rates and usage increased consistently from 2000 to 2010. However, the disparities in the Internet adoption and usage among the diverse Internet users were still observed. Gaps by age, education, income, and occupation were ubiquitously prominent except for gender and race; little difference was found between men and women for Internet access and between whites and African-Americans for Internet usage and scope. The evolution of the digital divides in Internet usage and scope were complicated because some gaps closed or opened periodically from 2000 to 2010. This research showed that Internet access rate and usage were negatively related to age but positively related to education and family income. The poorest, least educated, old or least privileged people still lagged behind in Internet access, usage, and scope. It is

too early to declare the battle against the digital divides won. The findings of this research call for further education and training for the laggards to narrow the existing gaps.

### **Introduction to the Problem**

The Internet is one of the most innovative technologies of the 21<sup>st</sup> century and has had an explosive growth in the last twenty years both in the total number of Internet users and in online activities. This technology was expected to transform society by reducing inequality and bridging the gap between the rich and poor among countries or within a country. However, many researchers have found that significant differences in Internet adoption occurred due to the degree of users' background, interests, and skills (Dholakia, 2006; Dwivedi & Lal, 2007; Egea, Menéndez, & González, 2007; Taylor, Zhu, Dekkers, & Marshall, 2003). These researchers investigated these issues and pointed out that socio-demographic traits were significantly associated with Internet usage (Goldfarb & Prince, 2008). They emphasized that there were gaps in Internet access and usage and further pointed out that the African-American and some minority groups, women, the poor, less educated, low income, old, or people with less prestige professions did not get the full advantages provided by Internet services (Hoffman & Novak 1996; White 1997). They emphasized that the consequence of such disparity could be devastating and urged governments to subsidize the disadvantaged groups to promote Internet access to the whole population.

In contrast to the claim of the existence of gaps and their looming effect, the opponents contested the existence of a digital divide or its severity. Powell (2001) acknowledged that there

might have been a gap for a short period of time before the ubiquitous spread of the Internet, but claimed that such a gap was closing, and may have already disappeared. He argued that the advocates of the imaginary digital divide used outdated surveys to support their positions and further claimed that federal initiatives aimed at the elimination of a nonexistent divide were misdirected. Picking up where Powell left off, Compaine (2001) declared that the war against the digital divide had been won since any gap had been closing ahead of the impact of federal dollars into the system. Powell and Compaine argued that any continued insistence of a digital divide issue was due to stereotyping, mass media propaganda, and were therefore misleading.

The advocates of the digital divide rebutted the dispute by Powell (2001) and Compaine (2001) and insisted that the digital divide issue was not just restricted to access, but that it also involved a complicated and multifaceted phenomenon (DiMaggio & Hargittai, 2001; Min, 2010; Selwyn, 2004; Yu, 2011). The advocates pointed out that having Internet access does not reflect the frequency of the usage, and the usage of the Internet does not automatically convert into quality usage (Bonfadelli, 2002). These advocates suggested that the investigation of the digital divide should be approached in a more comprehensive manner (DiMaggio & Hargittai, 2001; 2004; Yu, 2011). Selwyn (2004) proposed that it would be more meaningful to combine the access, usage and effectiveness of the Internet usage into the same investigation.

Obviously, there has been significant disagreement about whether the gaps in access and use of the Internet exist, or whether they are decreasing across the whole population of the United States.

Some researchers argued that eventually most people would be online, and no government intervention was necessary to accomplish equal access and usage among the individuals (Compaine 2001). Others researchers emphasized the persistent differences of Internet adoption and usage among various groups of the population (Dickard 2002) and the complicated digital divide issue. These differences of opinions have shown that there is a need for a more systematic and comprehensive investigation to confirm or deny the existence of the gaps in terms of the Internet access, usage, and scope. It is also necessary to reveal if there have been any evolving trends in the digital divide in recent years (Dholakia, 2006; Egea, et al., 2007).

This research offered an investigation of the digital divide at different levels, and examined Internet adoption trends in the United States with a special emphasis on users' socio-demographic characteristics (age, gender, race, income, education, and occupation). This investigation to determine whether or not the gaps have been closed was based on a ten-year series of nationwide surveys that were conducted in the United States. Participants were adults who were eighteen years old and over, and the surveys were completed in household settings.

This research was the first longitudinal investigation of the digital divide issues on a large scale at multiple levels. Previous studies usually examined the digital divide issues on a smaller scale and typically checked on a single level such as access, or usage, but not both. This research is different and unique. Three dimensions of the digital divide phenomenon were examined: Internet access, Internet usage, and Internet scope. The data targeted the whole US population and was

obtained from randomly sampled surveys conducted in the period from 2000 to 2010. Several quantitative analyses were applied to reveal the differences and trends from the vast amount of GSS data. Six socio-demographic factors were simultaneously evaluated in the statistical models. The whole research was considered on a large scale, and was more sophisticated and comprehensive than previous studies. The research answered the following three questions:

1. Are there any patterns in Internet access, usages, and scope on the basis of socio-demographic factors such as gender, age, race, education, income, and occupation?
2. Are there any evolving trends in Internet adoption, usage, and scope?
3. What are the major socio-demographic factors that influence the access, usage, and scope of the Internet in household settings?

Six composite null hypotheses were proposed and subsequently tested using Chi-Squared tests or ANOVA analyses:

H<sub>1</sub>: There is no significant difference in Internet (a) access, (b) usage, and (c) scope based on *gender*;

H<sub>2</sub>: There is no significant difference in Internet (a) access, (b) usage, and (c) scope based on *age*;

H<sub>3</sub>: There is no significant difference in Internet (a) access, (b) usage, and (c) scope based on *education level*;

H<sub>4</sub>: There is no significant difference in Internet (a) access, (b) usage, and (c) scope based on

*profession;*

H<sub>5</sub>: There is no significant difference in Internet (a) access, (b) usage, and (c) scope based on

*family income;*

H<sub>6</sub>: There is no significant difference in Internet (a) access, (b) usage, and (c) scope based on

*race;*

The following discussion summarized the results and was organized by the research questions and hypotheses to be answered:

### **Research Question 1**

*Are there any patterns in Internet adoption and usages on the basis of socio-demographic factors such as age, gender, race, education, income, and occupation?*

To answer this question, Chi-Squared test and ANOVA were performed to verify the six null hypotheses in three facets of the digital divides. The rationale is that if one of the hypotheses is rejected in that digital divide investigation, the difference (gap) is confirmed and the pattern can be revealed. The findings from this research showed that significant differences existed, and digital divides in all three levels were still opened for most socio-demographic factors.

#### **Internet access divide.**

As for the first level of the digital divide, the results show that the divide in Internet access had not fundamentally changed in the ten year period from 2000 to 2010. Chi-Squared test supported Hypotheses 1 (H<sub>1a</sub>) only but rejected the other five hypotheses, meaning that, except for

gender, significant differences or patterns in Internet access were found in age, education, income, occupation, and race categories.

### **Internet usage divide.**

ANOVA results indicate that the digital divides in Internet usage remained open but with some complex patterns. Basically, differences were found in age, education, occupation, and income but not noticeable in gender and race. However, the differences (or patterns) were not as consistent as those found in Internet access. In general, the poorest, the least educated, the old, or the least privileged people still lag behind in Internet usage, but gender and race might no longer be important in predicting Internet usage. As many researchers pointed out, the second level of the digital divide will not close because it is a complicated and multi-layered phenomenon (Min, 2010). To have Internet access is relatively easier, as the cost for the Internet has been reduced and many subsidies have been provided by the government. To use the Internet to its maximum is another issue, as motivation and attitude toward the Internet play a much more important role as predicted by Technology Acceptance Model (Davis, 1993; Manuel & José, 2005). If the potential users cannot perceive the value of the Internet, they will not take the full advantage. Such rational has been proven to be true for the third digital divide discussed next.

### **Internet scope divide.**

ANOVA results revealed that digital divides in Internet scope presented some complicated patterns. The divides by gender, education, occupation, and income remained open for the whole



investigated period without much change. The divide by age was not observed in 2000 but developed thereafter and remained open. The divide by race was periodically opened and closed, and then reopened. Because of the lack of data in GSS surveys after 2004, no further knowledge can be obtained about the patterns at the present.

The results of this research suggest that younger, more educated, richer, or more privileged Internet users were frequent visitors to websites related to study, work, and career. There was a striking difference between men and women in Internet activities. Men were more interested in websites for e-banking, e-government, e-learning, and e-library. The difference may derive from the fact that women were historically unconcerned about or uncomfortable with those activities so that they showed low interests on those websites. People with higher education were frequent visitors to these websites too, and the gap in Internet scope mainly occurred between the users with a bachelor or above and those without a bachelor degree. The gap of Internet scope by age groups and generations existed, and the difference occurred mainly between the most senior age group (>70) and the rest of the other age groups. The differences by occupation mainly occurred between those with occupation score of 50 or above and those with occupation score below 50. This fact support the previous studies that the Internet is useful in performing job related tasks, and people with higher occupation prestige scores had more online skills and used the Internet for more beneficiary purposes (Dwivedi & Lal, 2007). The disparity in Internet scope by income was persistent and deteriorated with time. The differences mainly occurred between income levels of \$75,000-\$110,000

or above, and income levels of \$25,000-\$50,000. Race did not significantly affect the index scores of Internet scope, although Asians scored a little higher than other races.

In summary, people are not homogeneous; Internet users behave differently due to their socio-demographic features as indicated by many previous studies (Egea, et al., 2007; Goldfarb & Prince, 2008; Hargittai, 2002; J. Robinson & Martin, 2010). Such differences lead to the variations in Internet access, usage, and scope. The long-debated disparities on Internet adoption and usage among the diverse Internet users were still observed from this research. The result of this research supports the advocates' assertion that removing the digital divides needs more time and effort (Min, 2010).

## **Research Question 2**

*Are there any evolving trends in Internet adoption and usage?*

The answer is positive, as revealed by monitoring the Internet access rates and weekly usages of web and email in this longitudinal study. This research used ANOVA to evaluate the magnitude of the evolving trends. The results show that the Internet adoption rates increased significantly from 2000 to 2010, so as the length of online activities. Although there was an increasing trend in Internet scope in the period (2000-2004) investigated, the magnitude, however, was too small to be significant.

The percentage of people who had Internet access climbed from 59% in 2000 to 84% in 2010, while the percentage of non-Internet users dropped from 41% to 16%. Few people nowadays

do not have Internet access because there are so many channels for them to get online; for example, they can use desktop computers or mobile devices through wired or wireless networks. Thanks to broadband connection and fixed rate billing cycles, there was an increasing trend of Internet usage, from the mean use of 4.94 hours per week in 2000 to 7.89 hours in 2010. The index scores for Internet scope crept up a little, but the magnitude was not significant statistically. Even though more Internet users visited the websites that were beneficial to their social status, their habitual visiting patterns remained unchanged for the period (2000-2004) investigated.

The influence of socio-demographic differences on Internet adoption and usage patterns also showed some evolution. Gender and race factors became less important while age, education, income, and occupation continued to be important for the diffusion of Internet technology into the household environment. As a result, gaps by gender and race might have been closed, while gaps by age, education, income, and occupation remained open. The results of the trend analysis suggest that the poorest, the least educated, the old, or the least privileged people still lagged behind in reaping the potential benefits provided by the Internet.

This research supports another aspect of Rogers' diffusion of innovation theory, that is, as for any new innovation, time is critical in allowing the innovation to infiltrate into the public domain (Rogers, 1997). Rogers' theory precisely portrayed the evolution of the Internet access and usage. Internet access rate followed an S-shaped curve and seemed to have passed the critical point and leveled off with much slower growth. In the course of Internet adoption and usage development,

early adopters were those that were younger, educated, financially secure, or worked in high occupation prestige jobs. Laggards were the aged or those with limited education and income. Most people were between the two demographics and adopted or accepted the Internet after it became popular. Obviously, some socio-demographic factors impacted more on the digital divides than the others, as discussed in the next question.

### **Research Question 3**

*What are the major socio-demographic factors that influence the access, usage, and scope of the Internet in household settings?*

To best answer this question, regression analyses were applied to the data to find the relationships and measure the strength between the dependent variable (Internet access, usage, scope) and the independent variables (socio-demographic factors). The results show that age, education, income, and profession were the major socio-demographic factors on the Internet divide. Internet adoption and usage were negatively related to age but positively related to education, income, and occupation. Gender had little effect on Internet access and usage except on the Internet scope. Race had some influence on the access and usage in earlier years, but its magnitude diminished quickly with time.

Specifically, age was negatively related to Internet access rate and usage due to the fact that adults 55 or above were hesitant to adopt the Internet and reluctant to stay longer online. Education

and family income were positively related to the access and usage of the Internet: adults with higher education and income were more likely to have Internet access than those with less education and income. Educated users were more interested in websites that offered positive results to their social status. Wealthier Internet users visited websites that were finance related more frequently. Prestige scores were usually positively correlated to Internet adoption rate and weekly usage. White and Asian groups had higher Internet adoption rate too in earlier years. However, the strength of the correlation by occupation and race were weak at the present time (2010). Gender was usually negatively related to Internet adoption and usage: men were more willing than women to adopt the Internet and to use it. The strength of such relationship was not strong and had little predicting power for the adoption rate and online frequency. However, gender turned out to be an influential factor with high predicting power for Internet scope. Men scored higher in the scope index, meaning that they visited websites that were beneficial to their socio-economic status more frequently.

In summary, age, education, income, and occupation were more important to Internet adoption and usage, which generally match the findings from the literature review (Egea, et al., 2007). The findings from this research have some profound application and implications.

### **Limitations**

The major limitations of this research are: (1) there are gaps in data that prevent a completed longitudinal investigation, (2) the sampling might have overlooked some portions of the US population due to language problems, and (3) not all factors were included in this digital divide research.

## Recommendations

Future research is recommended to overcome some of the main limitations from this research. It is necessary to further monitor and verify if the digital divide is opened and how Internet adoption and usage are evolving among US users. The recommendations include adding new data, new variables, new statistic tools, and new dimensions to the digital divide research.

In summary, the research on the digital divide is an ongoing effort that merits continuous investigation and monitoring. The longitudinal study should be carried out with newly available data. Other variables and statistical methods should be introduced into the research to broaden the knowledge in this area. The nature and effect of the gaps on Internet access, usage, and scope need to be fully understood. The benefits from the research are enormous, and the implications of its results are profound.

**Some tables and graphs are selected and illustrated here:**

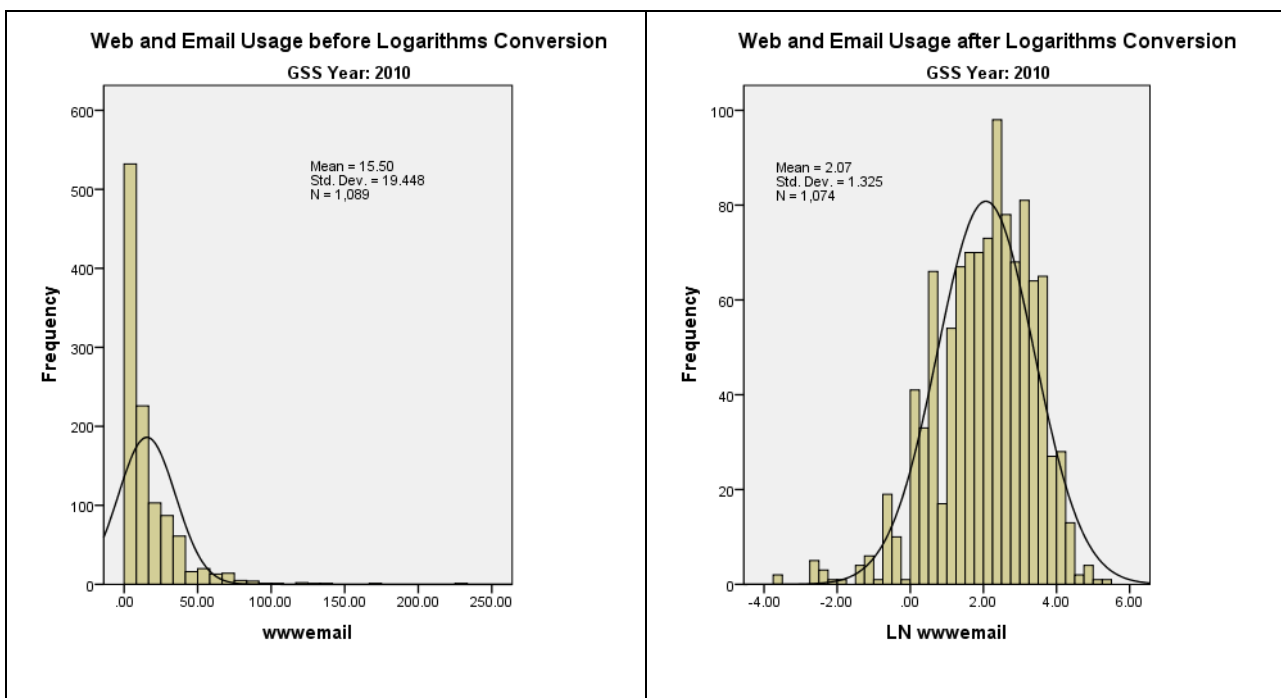


Figure 1. Distribution of Internet Usage Data before and after Logarithms Conversion

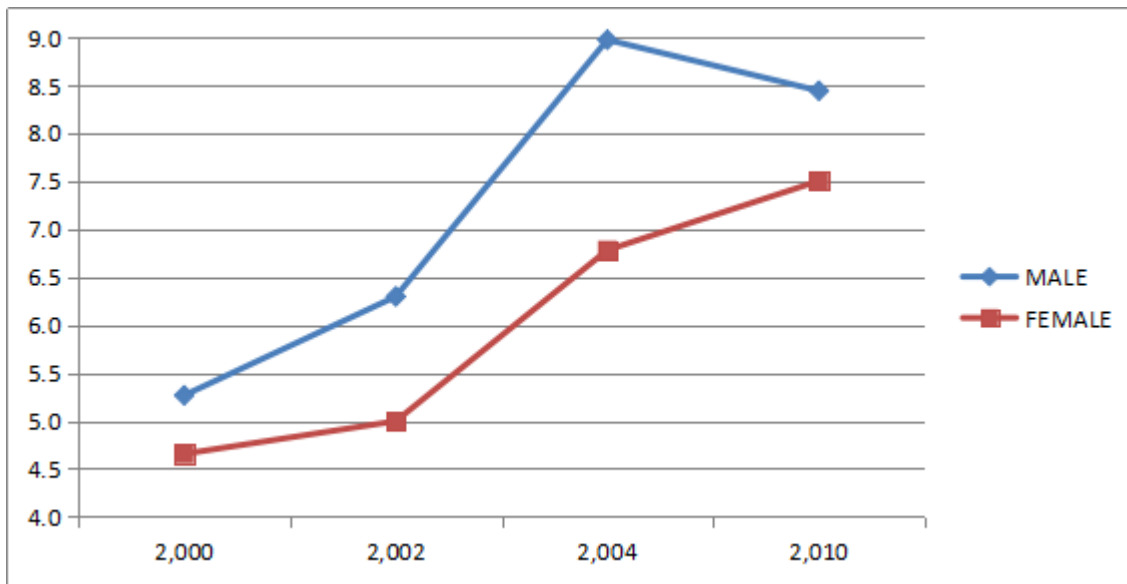


Figure 2. Internet Usage (Hours) vs. GSS Years for Gender

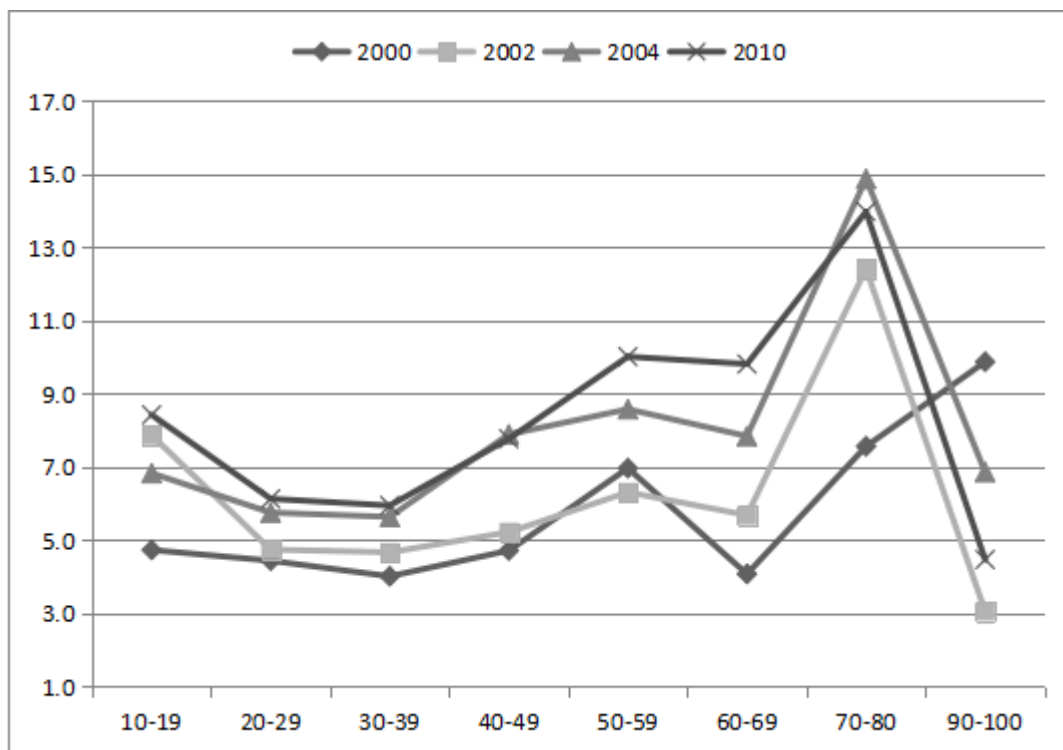


Figure 3. Internet Usage (Hours) vs. Occupational Prestige scores

Table 1. Model Summary of Regression Analysis of Internet Scope

GSS Year	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of Estimate	F	df1	df2	Sig. F
2000	0.375	.140	.132	5.549	15.962	6	586	.000
2002	0.352	.124	.118	5.495	20.911	6	886	.000
2004	0.419	.175	.167	6.014	20.367	6	575	.000

Table 2. Multivariate Regression on Internet Scope

GSS year	Independent variables	B	SE B	$\beta$	t	Sig.
2000	(Constant)	10.064	1.845		5.454	.000
	Age	-.028	.019	-.058	-1.450	.148
	Education***	.671	.106	.281	6.344	.000
	Income	.000	.000	.026	.625	.532
	White and Asian	.099	.576	.007	.172	.863
	Sex**	-1.266	.462	-.106	-2.737	.006
	Prestige Score**	.483	.186	.113	2.588	.010
2002	(Constant)	13.517	1.492		9.058	.000
	Age*	-.038	.015	-.084	-2.569	.010
	Education**	.455	.079	.202	5.735	.000
	Income***	.000	.000	.104	3.125	.002
	White and Asian	-.566	.479	-.038	-1.182	.238
	Sex***	-1.088	.371	-.093	-2.935	.003
	Prestige Score***	.586	.149	.139	3.929	.000
2004	(Constant)	15.677	2.226		7.042	.000
	Age***	-.090	.018	-.193	-4.878	.000
	Education***	.413	.115	.163	3.587	.000
	Income***	.000	.000	.116	2.720	.007
	White and Asian	.151	.650	.009	.232	.817
	Sex***	-1.830	.511	-.137	-3.584	.000
	Prestige Score***	.817	.206	.183	3.965	.000

Note. \*.  $p < .05$ , \*\*.  $p < .01$ , \*\*\*.  $p < .001$



## REFERENCES

- Bonfadelli, H. (2002). The Internet and knowledge gaps: A theoretical and empirical investigation. *European Journal of Communication, 17*(1), 65-84.
- Compaine, B. M. (2001). Declare the war won. In B. M. Compaine (Ed.), *The digital divide: Facing a crisis or creating a myth?* (pp. 315-336). Cambridge, MA: The MIT Press.
- Dholakia, R. R. (2006). Gender and IT in the household: Evolving patterns of Internet use in the United States. *Information Society, 22*(4), 231-240.
- DiMaggio, P., & Hargittai, E. (2001). *From the digital divide to digital inequality: Studying Internet use as penetration increases*. Princeton, NJ: Princeton University.
- Dwivedi, Y. K., & Lal, B. (2007). Socio-economic determinants of broadband adoption. *Industrial Management + Data Systems, 107*(5), 654-654. doi: 10.1108/02635570710750417
- Egea, J. M. O., Menéndez, M. R., & González, M. V. R. (2007). Diffusion and usage patterns of Internet services in the European Union. *Information Research, 12*(2).
- Goldfarb, A., & Prince, J. (2008). Internet adoption and usage patterns are different: Implications for the digital divide. *Information Economics and Policy, 20*(1), 2-15. doi: 10.1016/j.infoecopol.2007.05.001
- Hoffman, D. L., & Novak, T. P. (1998). Bridging the racial divide on the Internet. *Science, 280*(5362), 390-391.
- Powell, A. C. (2001). Falling for the gap: Whatever happened to the digital divide? In B. M. Compaine (Ed.), *The digital divide: Facing a crisis or creating a myth?* (pp. 315-336). Cambridge, MA: The MIT Press.
- Selwyn, N. (2004). Reconsidering political and popular understandings of the digital divide. *New Media & Society, 6*(3), 341-362.
- Taylor, W. J., Zhu, G. X., Dekkers, J., & Marshall, S. (2003). Socio-economic factors affecting home Internet usage patterns in central Queensland. *Informing Science Journal, 3*(1).
- Yu, L. (2006). Understanding information inequality: Making sense of the literature of the information and digital divides *Journal of Librarianship and Information Science, 38*(4), 229-252

- Yu, L. (2011). The divided views of the information and digital divides: A call for integrative theories of information inequality *Journal of Information Science*, 37(December), 660-679.
- Zickuhr, K. (2010). Generations 2010 Retrieved July 4, 2012, from [http://pewinternet.org/~media/Files/Reports/2010/PIP\\_Generations\\_and\\_Tech10.pdf](http://pewinternet.org/~media/Files/Reports/2010/PIP_Generations_and_Tech10.pdf)
- Zickuhr, K., & Smith, A. (2012). Digital differences. Retrieved from [http://pewinternet.org/~media/Files/Reports/2012/PIP\\_Digital\\_differences\\_041312.pdf](http://pewinternet.org/~media/Files/Reports/2012/PIP_Digital_differences_041312.pdf)
- Zillien, N., & Hargittai, E. (2009). Digital distinction: Status-specific types of Internet usage. *Social Science Quarterly*, 90(2), 274-291. doi: 10.1111/j.1540-6237.2009.00617.x

**好消息！美国华裔教授学者协会(USACSA)会员免费礼物如下：**

**你不能不知道的事！  
千真萬確！**

**特別報導**

xx公司的“靈芝王”產品，被消費者控告！法院案件號 EC062267。

另外，紐約中文電視臺，加州某製藥廠，及xx公司員工等等多達七起眾多案件分別在法院控告唯康公司。詳情及全文請上美國法院網站查詢。

**特別報導**

美國FDA食品和藥物管理局發出警告信，康潔麗公司的“潔宮寶”，“前列神通”等18種產品違反聯邦食品藥品和化妝品法案，詳情及全文請上FDA網站查詢。

**特別報導**

美國FDA稱“所有的非處方整合療法都不可信！”氨基酸整合法被視為美國十大健康欺詐行為之一！@all請轉發給你關心的人。

**特別報道**

愛德華25年良心事業，與一般的公司拉開了很大的距離，愛德華不僅有自己的現代倉儲，還有多家自己的商店，而一般的公司其產品多年至今**儲存在臥室和洗手間**



**為何天壤之別！**



**美國愛德華25年慶大聯歡! 免費吃喝玩樂大抽獎  
最高價值\$5888，前所未有，敬請期待！**

地址: 9552 Las Tunas Dr. Temple City, CA 91780

愛德華 1-888-6697-888 www.edvip.com

**好消息！持此页领取\$89礼物 參加免費大抽獎**



9552 Las Tunas Dr.  
Temple City, CA 91780  
美國愛德華花旗行禮物卡

**愛德華 25年慶  
大酬賓！**  
免費吃喝玩樂！  
免費大抽獎！

**最高價值 \$5888  
二等獎20名\$888** (分別價值)

**讓世界充滿愛德華·情**  
飯後百步走 活到九十九  
早上靈芝尊 晚上養肝素  
**祛病又強身  
首選靈芝尊**  
蟲草至尊 青春煥發 男女都愛  
1-888-6697-888  
www.edvip.com

請掃描加微信  
領取價值  
\$89禮物一份



- 特效養肝素
- 特效眼明素
- 特效前列通
- 美國心腦康
- 美國金智商
- 美國靈芝尊
- 蟲草至尊
- 燕窩至尊
- 口服美自素
- 高純度羊胎素
- 排毒祛脂茶
- 美國強骨質素
- 糖尿穩定素
- 純天然補腎
- 更年清平衡素
- 美國煙清素

**特大喜訊！**

25年慶禮物價值\$18, \$26, \$66, \$89, \$132, 此卡僅限1人使用, 限1份禮物, 每天限60名 (請按郵戳日期, 之後15天內致電有效) 持此卡親蒞愛德華花旗行者, 須核對ID, 可參加免費大抽獎, 無須購物, 須排隊, 最高價值\$5888 (任何禮物僅付\$1)

限2018年10月21日下午



謝謝您對愛德華25年的支持和愛護！—美麗達人紅小姐

**靈芝尊®特效養肝素®美國政府商標和專利局證書,國際公認!**



华中科技大学

南加州校友会

热烈祝贺

美国华裔教授学者协会

成立 20 周年



华中科技大学南加州校友会(HUST-AASC)于2002年4月6日在南加州尔湾市正式成立。校友会是在华中理工大学, 同济医科大学, 和武汉城建学院合并后, 由部分原华中理工大学校友和原同济医科大学校友共同发起成立的。HUST-AASC的建立和发展经过10任校友会执委会、理事会及众多南加州校友的共同努力, 已经发展壮大成为超过500位注册校友、颇具规模的校友会。

2018-2019 执委会会长: 陈勇 博士

2016-2018 理事会主席: 傅波 博士

## 精选保险理财

STAR CHOICE INSURANCE SERVICES

加州健保, 个人, 团体

请联系: AMY CHOI 徐浩婷



4110 Edison Ave #202, Chino, Ca 91710

Tel: 909-590-3588, 626-215-6601

email: amychoi@starchoiceinsurance.com

Ca license: 0B93747