



美国《医学索引》(IM)源期刊
美国《化学文摘》(CA)源期刊
俄罗斯《文摘杂志》(AJ)源期刊

ISSN 1000-2588
CODEN DJUXEX

DI-YI JUNYI DAXUE XUEBAO

第一军医大学 学报

Journal of First Military Medical University

第22卷 第8期 Vol.22 No.8

8

2002

中国综合性医药卫生类核心期刊
中国科技论文统计源期刊
《中国科学引文数据库》核心库来源期刊
《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊



中国 广州

Guangzhou China

告读者者者

《第一军医大学学报》通过评审被接纳为美国医学索引文献源期刊

6月19日美国国立卫生研究院NIH下属国立医学图书馆NLM通知我编辑部表NLM通过评审正式接纳《第一军医大学学报》为其印刷版Index Medicus和电子版MEDLINE的文献源期刊。这是我学报于2001年进入俄罗斯文摘杂志2002年3月进入美国化学文摘A之后被另一重要国际检索系统收录。

IM是当今世界上最常用的生物医学文献检索系统，收录全球70多个国家和地区90余种文字的3630种生物医学及相关学科期刊。与其他检索系统相比，IM收录信息量大，编辑力量强，报道文献速度快。IM有一个由医学专家、编辑和情报人员组成的文献选摘技术评论委员会，即Literature Selection Technical Review Committee, LSTRC，为其筛选期刊。该委员会对《第一军医大学学报》的总体评语是Very good，尤其对我刊的英文摘要给予了较高评价。期刊进入IM相对较难，根据中国高等学校自然科学学报研究会对外联络委员会的统计数据，至2001年底我国共有62种生物医学期刊被IM收录，其中大陆53种，台湾7种，香港2种。大陆的53种中除去生物学和工程学方面的8种，纯医学杂志只有45种，中华系列66种，收入19种，含大学学报3家，即同济、湖南、湘雅、华西。今年新增加了《第一军医大学学报》，为军内首家。

我学报在成为中国科技论文统计源期刊、中国综合性医药卫生类核心期刊、中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、来源期刊，并被中国期刊网、中国学术期刊光盘版、中国科技期刊数据库全文收录的基础上，于2001年被中国科学院文献情报中心列入统计源期刊，064种核心期刊，33种被引频次最高的中国科技期刊500名排行榜，中国有刊号的科技期刊近5000种。2002年3月被CA收录，2001年第1期开始又被IM收录，标志着本学报在近几年的稳步发展中又上了一个新台阶。

学报成绩的取得与我刊审稿专家的辛勤劳动、广大作者和读者的关爱以及各级领导的支持密不可分。我们诚挚地希望大家一如既往地关心、支持我学报，使本刊百尺竿头，更上一层楼。

大家知道，国内医学高等院校、科研院所及省市级医学情报机构一般都订购CA、A、EM等的印刷版，但同时备有光盘版或网络版提供检索的只有IM。因此，不但本科生及研究生的文献检索必修课之一是IM，课题立项、成果评定等的查新检索用的也是IM。可见，在医学研究领域，IM期刊论文的被检索利用率远比CA等其他源期刊的高。由于我刊被IM和MEDLINE同时收录，从今年起凡在我学报发表的论文，不仅在国内而且在全球各地均能被检索。更重要的是，只要我们按要求及时将所刊论文按XML(扩展标记语言)格式传送给NLM，在学报印刷版刊出之前就可让世界各地读者通过PubMed先期看到论文摘要。这对缩短论文从发表到被利用的时差，提高所刊论文的国际影响力具有重要意义。

作者朋友们，本学报国内外公开发行，也面向国内外作者征稿。尽管比例有限，但可择优录用。尤其国家重点基金项目基金论文，更可即收即发。为了您的论文尽早让全世界的读者查阅，利用，立即向《第一军医大学学报》投稿吧！

《第一军医大学学报》编辑部

第一军医大学学报
第 22 卷第 8 期 2002 年 8 月

目 次

基础研究

胞内精子注射法制备转基因爪蟾的研究 江培洲袁湘玲袁华袁渊73页
大肠癌相关抗体 Fab 段噬菌体呈现库的表达和活性鉴定 孙逊袁保平袁冰袁渊78页
大鼠纹状体边缘区和海马的功能联系研究 宁群袁舒斯云袁包新民渊84页
培养大鼠星形胶质细胞牵张损伤后超微结构的变化 王克万袁松涛袁志焕袁渊87页
一株输血传播病毒新变种的克隆和序列分析 刘志华袁路抗先袁柯海棠渊90页
日本血吸虫新基因 ~~要要~~腺苷酸激酶基因的发现与克隆 彭鸿娟袁晓光袁卢晓昭袁渊93页
紫外线照射前后日本血吸虫尾蚴抗原的初步分析 李华袁晓光袁培梁袁渊97页
Fas 基因转导大肠癌细胞株的表达 李恕军袁冰袁泊袁渊00页
补阳还五汤对大鼠脑皮层神经元生长的影响 佟丽袁宏达袁育尧袁渊11页
迷走神经刺激对大鼠癫痫抑制的作用 杨红军袁月三袁渊16页
HIV 基因芯片的初步研究 李凌袁马文丽袁向明袁渊24页
编码霍乱肠毒素 B 亚单位基因植物表达载体的构建 彭志强袁翰守义袁迪求袁渊36页
细胞间粘附分子 -1 单抗防治初发期急性肾小管坏死的实验研究 刘俊袁力袁王小宁渊48页

临床研究

醛固酮合成酶基因多态性与肥厚型心肌病相关性研究 陈爱华袁文秀袁志樑袁渊04页
肝素锂抗凝采血对 FT₃、T₄ 及 TSH 测定的影响 何国荣袁蔚袁黄玉英渊21页
定量分析两种治疗方案与危险指数对慢性髓系白血病临床缓解率的影响 ... 杜庆锋袁晓力袁启发袁渊29页
应用超选择动脉灌注化疗治疗残胃癌复发癌 何建苗袁楠永东袁曹志宇袁渊34页
MRI 在颅内生殖细胞瘤诊断中的作用 邱士军袁张雪林袁君仁民渊39页
癫痫过程和抗癫痫药物治疗对泌乳素分泌的影响 王明芳渊42页
低温保存有活性同种带瓣主动脉治疗复杂先天性心脏病渊2例报告冤 骆学全袁张文袁波袁渊45页
心脏移植术后非排异期超声心动图表现特点渊1例报告冤 张振袁王武军袁小明袁渊55页

技术方法

应用多重 PCR 法对广东地区 HBV 进行基因型渊-F 冤分型 杨洁袁琳袁亚兵袁渊07页
显微外科技术建立兔异体原位肾脏移植模型 张勇袁立新袁袁英斌袁渊13页
应用十六烷基三甲基溴化铵纯化 PCR 产物 张宝袁马文丽袁莉扬袁渊19页
应用 PCR 技术检测假肥大型肌营养不良 刘咏梅袁封志纯袁方振伟渊31页

经验交流

优势型冠状动脉闭塞致其他部位心肌梗死 邱明袁李公信袁映峰渊09页
布-加氏综合征的临床影像分析渊81例报告冤 张艳莉渊27页
肾移植引起的急性排斥反应的治疗 于立新袁袁英斌袁张勇渊52页
地塞米松对硬膜外腔应用吗啡所致恶心呕吐的影响 吴又武袁建设袁仲清袁渊58页
先天性齿槽突裂整复术渊10例报告冤 罗渝宁袁少萍袁伟忠袁渊60页
急诊床旁超声心动图在急性心肌梗死病人监护病房的临床应用价值 王鹏袁文袁志斌袁渊62页

病例报告

以双上睑下垂为首发症状的中脑海绵状血管瘤 1 例 潘锦权袁亮渊15冤
血浆置换治疗血栓性血小板减少性紫癜 2 例报告 尹芳袁孟凡义袁周淑芸袁等渊50冤
全心外右心旁路手术 1 例报告 蔡开灿袁王武军袁卞立志袁等渊54冤
支气管异物的外科治疗 朱平渊63冤
卵巢癌脾脏转移 1 例报告 刘国炳袁张广亮袁鄢福祺渊64冤
松果体区垂体嫌色细胞腺瘤 1 例报告 冯文峰袁漆松涛袁彭林袁等渊65冤

医学英语写作系列讲座

医学科技论文结果部分图表有关内容的英文表达 王征爱袁宋建武渊66冤

其他

征订《医学综述》渊83冤 可延缓亨廷顿舞蹈症发作的胆汁酸渊86冤 更正渊99冤 焦虑有关的基因渊03冤 减
少癌症发生的酶渊06冤 自体免疫疾病相关的基因渊20冤

总编辑院王征爱

本期责任编辑院袁锦雅

英文责任编辑院宋建武

本期技术编辑院温彩红

本期责任校对院黄开颜

期刊基本参数院N44-1152/R*1981*m*A4*96*zh+en*P*预读*1500*38*2002-08

Journal of First Military Medical University
Volume 22 Number 8 August 2002
Contents

Basic Research

- Establishment of transgenic *Xenopus laevis* by intracytoplasmic sperm injection
..... JIANG Pei-zhou, FENG Xiang-ling, HUANG Hua, et al (673)
- Expression and identification of phage display library for Fab fragments of colorectal cancer-related antibodies
..... SUN Xun, WU Bao-ping, XIAO Bing, et al (678)
- Functional connection between the marginal division and hippocampus in rats NING Qun, SHU Si-yun, BAO Xin-min (684)
- Ultrastructural features of cultured rat cortical astrocytes with stretch-induced injury
..... WANG Ke-wan, QI Song-tao, YANG Zhi-huan, et al (687)
- Cloning and sequence analysis of a novel TT virus variant LIU Zhi-hua, LUO Kang-xian, HE Hai-tang (690)
- Identification and cloning of aadenylate kinase gene, a novel gene of *Schistosoma japonicum*
..... PENG Hong-juan, CHEN Xiao-guang, LU Xiao-zhao, et al (693)
- Preliminary analysis of cercaria antigen of *Schistosoma japonicum* before and after ultraviolet irradiation
..... LI Hua, CHEN Xiao-guang, YANG Pei-liang, et al (697)
- Expression of Fas gene transduced into colorectal cancer cells LI Shu-jun, XIAO Bing, JIANG Bo, et al (700)
- Effects of Buyanghuanwu decoction (BYHWT) on proliferation of cultured rat cortical neurons
..... TONG Li, QU Hong-da, CHEN Yu-yao, et al (711)
- Seizure inhibition by vagal nerve stimulation in rats YANG Hong-jun, HU San-jue (716)
- Preliminary study and development of gene chips for HIV diagnosis LI Ling, MA Wen-li, MAO Xiang-ming, et al (724)
- Construction of plant expression vectors containing the gene encoding cholera toxin B subunit
..... PENG Zhi-qiang, YU Shou-yi, YU Di-qiu, et al (736)
- Experimental study of monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 for incipient acute tubular necrosis
..... LIU Jun, WANG Li, WANG Xiao-ning (748)

Clinical Research

- Association between aldosterone synthase gene polymorphism and hypertrophic cardiomyopathy
..... CHEN Ai-hua, ZHANG Wen-xiu, LI Zhi-liang, et al (704)
- Effect of heparin lithium anticoagulant in assay of FT₃, FT₄ and TSH HE Guo-rong, CHENG Wei, HUANG Yu-ying (721)
- Quantitative analysis of Sokal's risk index in relation to 2 therapy protocols: their respective impact on clinical remission of chronic myeloid leukemia
..... DU Qing-feng, LIU Xiao-li, LIU Qi-fa, et al (729)
- Superselective intra-arterial infusion chemotherapy for recurrent cancer in the remnant stomach after partial gastrectomy
..... HE Jian-miao, PU Yong-dong, CAO Zhi-yu, et al (734)
- Role of magnetic resonance imaging in the diagnosis of intracranial germinoma
..... QIU Shi-jun, ZHANG Xue-lin, CHANG Ren-min (739)
- Effect of seizures and antiepileptic drugson prolactin secretions WANG Ming-fang (742)
- Cryopreserved viable pedicled aortic homografts for complex congenital heart diseases: report of 2 cases
..... LUO Xue-quan, ZHANG Wen, ZHANG Bo, et al (745)
- Echocardiographical features during the rejection free period after heart transplantation: report of one case
..... ZHANG Zhen, WANG Wu-jun, ZOU Xiao-ming, et al (755)

Techniques and Methods

- Application of multiplex PCR in genotyping of hepatitis B virus prevailing in Guangdong Province of China
..... YANG Jie, DAI Lin, GUO Ya-bing, et al (707)
- Establishment of rabbit model of renal allograft transplantation using microsurgical technique
..... ZHANG Yong, YU Li-xin, JIA Ying-bin, et al (713)
- Purification of PCR products with cetyltrimethylammonium bromide ZHANG Bao, MA Wen-li, LIU Li-yang, et al (719)

Application of PCR technique in genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy
..... LIU Yong-mei, FENG Zhi-chun, FANG Zhen-wei (731)

Clinical Experience

Myocardial infarction in regions not corresponding to occlusion of dominant coronary artery
..... QIU Ming, LI Gong-xin, LIU Yang-feng, et al (709)
Analysis of the clinical manifestations and imaging features of Budd-Chiari syndrome: report of 81 cases ZHANG Yan-li (727)
Management of acute rejection of kidney allograft YU Li-xin, JIA Ying-bin, ZHANG Yong (752)
Effects of dexamethasone on epidural morphine-related nausea and vomiting
..... WU You-wu, XU Jian-she, CHEN Zhong-qing, et al (758)
Surgical correction of congenital alveolar cleft: report of 10 cases LUO Yu-ning, LI Shao-ping, LI Wei-zhong, et al (760)
Clinical value of emergency bedside ultrasonography in cardiac care unit WANG Peng, WU Wen 文, XIE Zhi-bin, et al (762)

Case Report

Maservephalic arteriovenous hemangioma with bilateral upper eyelid ptosis as the initial symptom: report of one case
..... PAN Jin-qian, ZHOU Liang (715)
Plasma exchange for thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 2 cases YIN Fang, MENG Fan-yi, ZHOU Shu-yun, et al (750)
Right heart bypass by extracardiac approach: report of one case CAI Kai-can, WANG Wu-jun, NIU Li-zhi, et al (754)
Surgical treatment of aspiration of foreign body in the bronchus ZHU Ping (763)
Ovarian carcinoma metastatic to the spleen: report of one case LIU Guo-bing, ZHANG Guang-liang, XING Fu-qi (764)
A pituitary chromophobe adenoma in the pineal region: report of one case FENG Wen-feng, QI Song-tao, PENG Lin, et al (765)

Serial Lectures on Medical Writing

English representation of tables and figure legends in the section of Results in medical papers ... WANG Zheng-ai, SONG Jian-wu (766)

Editor in Chief: WANG Zheng-ai

Executive Editor: WU Jin-ya

English Editor: SONG Jian-wu

Executive Technical Editor: WEN Cai-hong

Executive Proofreader: HUANG Kai-yan

胞内精子注射法制备转基因爪蟾的研究

江培洲¹袁冯湘玲²袁黄华¹袁沈新明¹袁史剑凌²袁姚开泰¹渊第一军医大学肿瘤研究所袁广东 广州 510515 曰中南大学湘雅医学院肿瘤研究所袁湖南 长沙 410078 冤

摘要 目的 研究爪蟾胞内精子注射法渊intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 转基因技术的可行性遥方法 取成熟雄蛙的辜丸分离纯化精子袁用毛地黄皂甙渊igitonin) 崩解精细胞膜并制备精子浓缩液袁然后与线性化报告基因载体 pCMV-EGFP-N1 共处理袁后将处理后的精子注射入从雌性爪蟾体内取出的未受精卵中袁培养并观察遥结果 制备的精子质量较高袁稀释的精子注射入未受精卵后袁卵的受精率为 10% 袁受精卵活过神经胚的比率为 20% 袁且都略微有点畸形遥其中袁绿色荧光报告基因 EGFP 的整合率为 81% 袁显微镜下未见绿色荧光蛋白的表达遥结论 ICSI 法是制备转基因爪蟾的简便可行的新途径遥

关键词 爪蟾 胞内精子注射法 显微注射 绿色荧光蛋白

中图分类号 院78 文献标识码 院 文章编号 院000-2588(2002)08-0673-05

Establishment of transgenic *Xenopus laevis* by intracytoplasmic sperm injection

JIANG Pei-zhou¹, FENG Xiang-ling², HUANG Hua¹, SHEN Xin-ming¹, SHI Jian-ling², YAO Kai-tai¹

¹Cancer Research Institute, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Cancer Research Institute, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, China

Abstract: Objective To study the feasibility of establishing transgenic *Xenopus laevis* by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Methods The testes of mature *Xenopus laevis* were taken for the purification of their sperms, which was subsequently incubated with digitonin to prepare concentrate of the sperms. Treatment of the concentrate with linearized reporter vector pCMV-EGFP-N1 was performed, and the sperms were then injected into unfertilized ova harvested from female *Xenopus laevis*, followed by culture and observation of the development of the ova. Results The condensed sperm we obtained were of high quality and after intracytoplasmic injection into the ova, a fertilization rate of 10% was achieved and 20% of the zygotes survived the neurula stages and developed into tadpoles, but all of which were slightly deformed. The integration ratio of green fluorescent protein (GFP) reporter gene was 81%, but GFP expression was not observed in the *Xenopus laevis*. Conclusion ICSI is a simple and practicable method for establishing transgenic *Xenopus laevis*.

Key words: *Xenopus laevis*; intracytoplasmic sperm injection; microinjection; green fluorescence protein

非洲爪蟾作为一种转基因动物模型袁在考察发育基因的调控和癌基因的功能方面有着重要价值遥经典的爪蟾转基因技术产生的动物模型如受精卵显微注射遥限制性酶介导的去浓缩精核染色体 DNA 的整合渊EMI) 转基因法存在不少缺陷袁或者是瞬时表达或者无法活过神经胚期遥近来袁有人采用胞内精子注射法渊intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 成功制备出转基因鼠袁在操作上较以往更为简单袁为转基因爪蟾的制备提供了新的思路遥因此袁我们尝试将 ICSI 方法运用于转基因爪蟾的制备袁以期寻找一种简便可行的新途径遥

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及试剂盒 亚精胺 渊permidinetrihy-

drochloride) 精胺渊perminetetrahydrochloride) 硫代苏糖醇渊TT) 小牛血清白蛋白渊SA) 毛地黄皂甙渊igitonin) sigma 公司 甘油尧Ioechst 胱氨酸 盐酸渊-cysteine hydrochloride) 琼脂糖尧庆大霉素尧Hepes acid (不含钠盐) 尧油渊gmacote) sigma 公司 孕马血清渊regnant mare serum gonadotropin) 人绒毛膜促性腺激素渊human chorionic gonadotropin) ICG 地高辛 3' 标记试剂盒 渊coche 公司) 冤

1.1.2 质粒 pCMV-EGFP-N1 表达载体为 Clontech 公司产品遥

1.1.3 主要仪器和器械 显微注射仪渊Drummond) 毛细玻璃管渊Drummond) 尧粒针仪渊Narishige) 尧磨针仪尧荧光显微镜渊lympus 公司) 尧体视显微镜渊Motic) 尧冷冻离心机尧DNA 扩增仪渊MJ Research) 尧电泳仪尧剪刀尧镊子尧尼龙滤网渊00 滋) 尧培养皿渊直径 6cm 和 3.5cm) 尧血球计数板尧注射器及针头渊号) 尧离心管遥

1.1.4 实验动物 非洲爪蟾购自北京中科院发育所袁雌雄均为 3~5 年性成熟动物遥

1.2 方法

收稿日期 院001-10-12

基金项目 院美国中华医学基金会渊6-655 冤

作者简介 院江培洲 渊975- 冤男袁袁江西九江人袁001 年毕业于第一军医大学袁博士袁电话 院20-61640114-89100

用 50U 的 PMSG 注射入雌性爪蟾的背部淋巴囊。在实验前 1 d 夜间继续注射 500 U HCG 入同样部位。每次至少注射两只以上。次日清晨雌蛙即开始排卵。挤压蛙的腹部采集卵子。随后用胱氨酸溶液去除卵块中的凝胶状物。当卵与卵之间开始接触就表明已经解凝。不同个体的卵解凝时间不一样,解凝时间不能太久,大概 5~10min。尽量减少解凝溶液的搅动次数。用 1 伊 MMR 漂洗 3 次。将卵转移至盛有 0.4 伊 MMR 含 6% Ficoll 的上预冷好的注射皿(溶于 0.4 伊 MMR)中。放置 5min。使卵贴紧皿底部,防止注射时滑动。

1.2.3.7 显微注射 将含精子注射液的注射针安装至显微注射仪上。确保精液已经到达了针头末端。每次注射 10nl。必须快速刺入每个卵的质膜。随后稍缓慢地抽出针头。针头刺入的角度应该与膜的表面垂直。这样就可以避免撕裂质膜。如果针头出现粘滞物。尽量使针头抬出液面。利用表面张力使阻塞物流出。注意针头不能穿透卵壳。否则很难存活。如果针头过于狭窄。或者注射过程中被碎片部分阻塞。精子会受损。最终导致非整倍体或单倍体胚胎。

1.2.4 胚胎的初始培养 注射后的卵转至 16 益的孵育箱中。放置 3.0~3.5h 后观察卵子受精情况。正常受精后的卵动物极能够分裂成 2~4 细胞。筛选受精卵转至盛有 0.1 伊 MMR 含 5% Ficoll 含 5 滋/ml 庆大霉素的胚胎培养皿中。溶于 0.1 伊 MMR 琼脂糖包被的 12 孔培养板中。每孔放置 3~4 个胚胎。

1.2.5 剥除卵黄膜 当胚胎进入囊胚期时。用两个尖镊子从胚胎的动物极开始剥除卵黄膜。使胚胎完全暴露于培养液中。

1.2.6 持续培养 当胚胎发育至原肠胚阶段。转移至盛有 0.1 伊 MMR 和 25 滋/ml 庆大霉素的胚胎培养皿

中持续培养。

1.2.7 观察记录发育状态及转基因表达结果

1.2.8 整合率的检测 提取绿色荧光蛋白表达阴性蝌蚪研磨液。按分子克隆方法提取基因组 DNA。通过 GFP 引物扩增 PCR 产物进行 Southern blotting 检测。报告载体整合率。上游引物序列为 5'-CACATGAA GCAGCAGACTT-3'。下游引物序列为 5'-GAAGTT CACCTTGATGCCGT-3'。4 益预变性 1min。后进入循环。4 益变性 40s。60 益退火 40s。72 益延伸 40s。35 个循环。2 益延伸 10min。在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳。产物长度为 267bp。设计 GFP 的探针为 5'-TATATCATGGCCGACAAGCA-3'。标记方法见 3'。地高辛标记试剂盒。Ligoche 公司。操作说明。Southern blotting 所有操作方法见分子克隆。

2 结果

制备的精核质量较高。最佳浓度的精核显微注射后的受精率为 10%。受精卵活过神经胚的比率为 20%。其中荧光报告基因 pCMV-EGFP 整合率为 81%。表达率为 0%。

2.1 卵细胞受精率

本次实验共注射了 2000 个卵细胞。根据 2~4 细胞期分裂状况筛选的受精卵有 186 个。

2.2 受精卵的成活率

筛选的 186 个受精卵中有 135 个卵。4 细胞期后出现不规则分裂。最终死亡。另有 14 个胚胎剥除卵黄膜时受损。卵黄逐渐流失。未能度过神经胚期。stage 28。剩余的 37 个胚胎顺利度过神经胚期。发育成游动的蝌蚪阶段。stage 45。蝌蚪都略微有点畸形。见图 1。

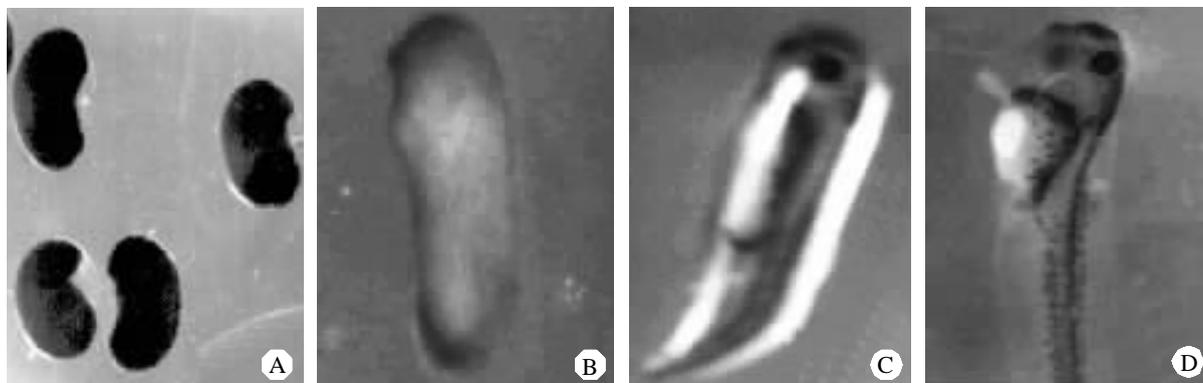


图 1 爪蟾胚胎神经胚期后的发育各阶段

Fig.1 Post-neurulastages of development of *Xenopus laevis* embryo

A:Stage13;B:Stage20;C:Stage28;D:Stage45

2.3 荧光报告基因表达率

对游动的蝌蚪进行荧光报告基因检测袁紫外线照射下袁只蝌蚪产生极微弱绿色荧光袁与以往的受精卵 DNA(绿色荧光报告基因 pCMV-EGFP-N1)显微注射结果有明显差异袁我们认为没有表达遥其余的未见荧光遥对照组荧光表达见图 2袁实验组无荧光表达渊图略冤遥

2.4 报告基因的整合率

对 37 只蝌蚪研磨提取基因组 DNA袁通过 GFP 引物进行 PCR 扩增和 Southernblotting袁证实其中的 30 只蝌蚪有报告基因载体的整合渊图 3 显示其中 4 只蝌蚪的阳性结果遥

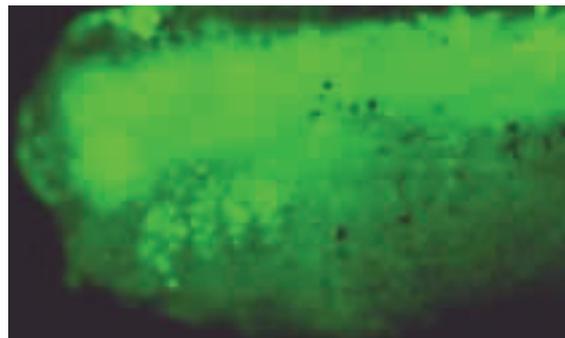


图 2 对照组绿色荧光蛋白在爪蟾胚胎体内的表达
Fig.2 Expression of green fluorescent protein in control *Xenopus laevis* embryo

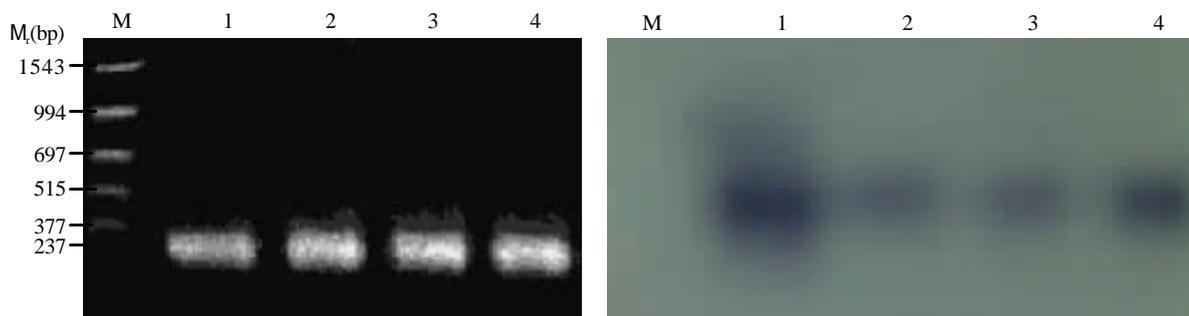


图 3 GFP 转基因爪蟾基因组 DNA 扩增的 GFP 产物(左图 1, 2, 3, 4)及转膜后的 Southernblotting 结果渊右图 1, 2, 3, 4冤
Fig.3 GFP product amplified from GFP-transgenic *Xenopus laevis* gDNA渊左图 1, 2, 3, 4冤and Southern blotting after transfer to membrane (right 1, 2, 3, 4)

3 讨论

非洲爪蟾属于两栖动物袁代表着脊椎动物发育的原始模式袁是经典胚胎发育学研究中常用的模式生物遥随着转基因技术的兴起袁蛙又成为一种转基因动物模型袁在考察发育基因的调控和致癌基因的作用方面有着重要价值遥与转基因鼠操作系统相比较袁非洲爪蟾胚胎系统具有实验周期短尧操作简单尧观察方便等优点袁一次实验可以轻松制备成百上千的受精卵袁实验例数远远超过小鼠遥在蝌蚪期袁体态透明袁脏骨骼等器官清晰可见遥在实验期间可以跟踪观察记录体内各器官组织发生的变异袁因此深受生物学家青睐遥经典的爪蟾转基因技术主要有受精卵显微注射 mRNA 和 DNA袁然而前者制备的动物模型只能瞬时表达袁后者往往是嵌合体遥REMI 法运用于爪蟾的转基因后袁基本上解决了制备整合型的难题袁但得到的动物往往是非整倍体袁而且很难活过神经胚期袁此外其操作方法也比较复杂遥ICSI 法是将精子头部细胞膜破坏后与线性化 DNA 共处理袁然后对未受精卵进行显微注射遥转基因鼠实验中已经证实袁CSI 法不仅继承了以往转基因技术的优点袁而且在操作程序上更为简单遥本实验选用该法用于爪蟾的转基因实验袁对其可行性做了初步研究遥

3.1 卵细胞的质量

对成熟的雌性爪蟾而言袁年龄越小卵子的质量越高遥卵子的质量在解凝时就能体现袁肉眼观察质量高的卵子袁植物极对比鲜明遥解凝时间必须准确把握袁解凝不彻底会造成注射时针刺十分困难遥解凝时间过长袁动物极明显面积缩小袁与植物极之间的界限十分清晰袁常被误认为质量较高的卵袁这种卵应该放弃遥雌性爪蟾可以重复采集卵子袁但是两次采集间隔的时间至少需要 3 个月袁否则再次收集的卵质量很差袁不适合注射受精遥此外袁每次用 PMSG 和 HCG 处理的雌蛙至少要两只袁使它们协同排卵袁单独处理的雌蛙很少成功排卵袁机制不明遥此外袁不同个体的卵解凝时间不一样袁必须即时观察袁当卵与卵之间开始接触应该立即终止解凝作用遥

3.2 睾丸和精子的处理

睾丸附带的脂肪体和血液影响精子的制备袁必须尽量排除遥对大的血管上应采用扎孔的办法袁轻轻地将血液挤出遥操作不当就会刺破睾丸袁漏出精子袁因此要特别小心遥血液排除不净会严重污染精子袁影响实验结果遥此外袁精细胞膜被毛地黄皂甙崩解后袁极易被损伤袁导致卵无法受精或生成单倍体等畸形胚胎遥因此使用的 Tip 头必须剪成钝端孔径略大袁并在火焰上

修平剪后留下的锐利边缘

3.3 浓缩精液的稀释浓度

贮存的精子是高度浓缩的悬液用于显微注射时必须适当稀释以保证每次注射时进入卵细胞的精子为1~2个这样受精及发育成功的几率最高适当制备一批精子浓缩液后取第一份稀释成几个浓度梯度进行注射选择受精率最高的浓度以后的浓缩液都可以依照此浓度稀释浓缩精子的稀释度把握不好会造成受精效率低下浓度过低往往造成单倍体畸胎过高则易造成非整倍体的畸胎

3.4 注射皿及胚胎培养皿

注射皿及胚胎培养皿中的琼脂糖凝固后应该放于4℃冰箱倒置存放可在三周内使用或者倒置放于室温两天内使用效果很好琼脂糖的作用是为了注射时卵子能够紧贴在底面以免滑动被琼脂糖的培养皿反复使用会稀释导致卵贴底效果不佳影响注射及培养

3.5 卵黄膜的剥离

卵黄膜会阻碍胚胎的正常发育因为人工受精的胚胎无法自主挣脱该层保护膜卵黄膜的去除在时间上要把握准确必须在囊胚中期及时剥除剥除过早会严重伤害受精卵导致卵黄流失或者动物极无法修复而死亡过晚则使胚胎发育受阻导致最终萎缩死亡在操作上也必须反复练习把握技巧使用的镊子应该非常尖锐在体视显微镜下等待剥离的胚胎此时的胚胎在卵黄膜的包裹下浑圆紧张单独放入盛满培养液的皿中调整好最佳倍数和视野后动物极着手左手镊子轻轻夹住动物极表层右手镊子在夹住的部位轻轻挑剥一旦触破卵黄膜则快速扯开使其包裹的胚胎脱离该层薄膜自由舒展暴露于培养液中去除了卵黄膜的胚胎体积明显膨大表面松软在囊胚期相比受精卵显微注射而言CSI法生成胚胎的卵黄膜与胚胎表面结合程度要紧密的多所以剥离更为困难胚胎动物极更容易受损不过囊胚中期剥除卵黄膜对胚胎发育的影响较小即使动物极部分受损也很快能得到自主修复如果在其它阶段或者在植物极剥离卵黄膜则损害无法修复

3.6 外源基因的整合率和表达率

外源基因与浓缩精子的共孵育效果直接影响转基因动物的整合率理论上外源基因浓度越高精子的整合率越高但是外源基因浓度越高对精子的损害也越大因此寻找外源基因的最佳浓度需要摸索从本实验来看选用的外源基因浓度对精子的整合效率较高但是产生的转基因动物没有绿色荧光蛋白的表达我们推测可能是外源基因对精子的损害整合在组织上的基因拷贝数少整合位点位于旁侧序列表

整合后的修饰甚至表达混乱等多种原因造成的

3.7 发育畸形的胚胎

筛选的186个受精卵135个卵4细胞期后出现不规则分裂最终死亡37个顺利度过神经胚期发育成游动的蝌蚪阶段0期蝌蚪都略微有点畸形我们认为受精卵的死亡可能是因为外源基因的浓度过高损害了精子或者注射时精子穿过注射针头时受损导致胚胎畸形的原因不排除上述两种情况但是注射剂量过大导致过多的精子进入卵细胞产生非整倍体也可能是原因之一

3.8 ICSI法与以往的方法比较

整合率较高操作方法比REMI法大大简化是ICSI法的最大优点实验结果的畸胎和报告基因不表达是转基因技术中常见的现象前者我们认为是未能准确把握最佳实验条件和操作不当导致后者除了可能有前面两种情况之外转基因技术中一些非人为控制的因素也是主要原因作为新的转基因技术ICSI法尚存在一些不足之处许多研究者正在进一步改进因而有着良好的应用前景本实验亦表明ICSI法用于制备转基因爪蟾是可行的

致谢谢本实验得到英国国立医学研究所发育生物学实验室Duncan B. Sparrow先生的无私帮助在此致以真诚的谢意

参考文献

- 蔡文琴, 李海标. 发育神经生物学. 北京: 科学出版社, 1999. 95-105.
- Hermna SS. Transgenic Xenopus. Humana Press Inc, 1997. 896-3457.
- Kroll KL, Amaya E. Transgenic Xenopus embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. Development, 1996, 122(10): 3173-83.
- Perry ACF, Wakayama T, Kishikawa H, et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. Science, 1999, 284(5417): 1180-3.
- Hirabayashi M, Kato M, Aoto T, et al. Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm. Transgenic Res, 2002, 11(2): 221-8.
- Faddy MJ, Silber SJ, Gosden RG, et al. Intra-cytoplasmic sperm injection and infertility. Nat Genet, 2001, 29(2): 131
- Xu XP, Huang Y, Wei JW, et al. Efficient expression of green fluorescent protein gene in rice cells. Zhiwu Xuebao, 1998, 40(1): 91-4.
- Fernández-Abalos JM, Fox H, Pitt C, et al. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, Aspergillus nidulans. Mol Microbiol, 1998, 27(1): 121-30.
- Nudel I, DM, Lipshultz LI. Is intracytoplasmic sperm injection safe? Current status and future concerns. Curr Urol Rep, 2001, 2(6): 423-31.

大肠癌相关抗体 Fab 段噬菌体呈现库的表达和活性鉴定

孙 逊 袁保平等 袁冰 袁张振书 袁颢卓胜 渊第一军医大学南方医院全军消化病研究所 广东 广州 510515 冤

摘要 目的 利用阳性重组菌 XL1-Blue-Pcomb3 表达出人源性大肠癌 Fab 段噬菌体原始库 渊相化人大肠癌组织及细胞的相关抗原后对其进行筛选 袁鉴定筛选后的抗体库与人大肠癌有无特异性的结合活性 遥方法 PCR 鉴定 XL1-Blue-Pcomb3 重链 Fd 段和 袁链的插入率 袁表达出人大肠癌 Fab 段原始库 遥然后提取 3 例用于构建原始抗体库的致敏大肠癌组织抗原 袁3 例非致敏大肠癌组织抗原及 3 种体外培养的大肠癌细胞株 LoVo 尧 HT-29 尧 LS-174T 的抗原 袁利用 3 组混合抗原分别对原始抗体库进行 3 轮筛选 袁将筛选后的 3 个三级库等体积混和后通过 ELISA 及免疫组化鉴定其与人大肠癌组织及细胞是否具有特异性的结合活性 袁取胃癌 尧食管癌及正常肠粘膜组织和胃癌 尧肝癌细胞进行对照研究 遥结果 Fd 片段及 袁链的插入率分别为 40% 和 70% 袁 d 片段及 袁链均插入质粒 Pcomb3 的重组率为 28% 袁 ab 段基因库容量为 2.1伊10⁶ 袁组大肠癌混合抗原分别对原始库进行 3 轮筛选后 袁抗体库均得到了不同程度的富集 袁 ELISA 及免疫组化显示富集后的抗体库对人大肠癌组织及体外培养的大肠癌细胞均有较特异性的结合活性 遥结论 利用噬菌体抗体库技术筛选到了人大肠癌相关 Fab 段抗体群 袁且筛选后的抗体群与人大肠癌抗原有较特异性的结合活性 遥

关键词 大肠癌 噬菌体呈现库 Fab 段表达

中图分类号 冤 735:R392 文献标识码 冤 文章编号 冤 000-2588(2002)08-0678-05

Expression and identification of phage display library for Fab fragments of colorectal cancer-related antibodies

SUNXun, WUBao-ping, XIAOBing, ZHANGZhen-shu, LAIZhuo-sheng

Institute of Digestive Diseases of PLA, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To express the original human Fab antibody phage display library with positive recombinant bacterium XL1-blue-Pcomb3 and identify its specific binding activity with colorectal cancer cells in vitro after screening with human colorectal cancer-related antigens. Method The recombination rate of Fd fragment of the heavy chain and insertion of 袁 chain of the antibodies was determined with PCR, and the original Fab library was expressed. The antigens were extracted from 3 sensitized colorectal cancer tissues previously used for construction of the original Fab library and from 13 non-sensitized colorectal cancer tissues, along with the antigens from LoVo, HT-29 and LS-174T cells cultured in vitro. The original Fab antibody library was screened with the 3 groups of mixed antigens derived in preceding procedure and 3 tertiary Fab antibody libraries were obtained, which were then mixed in equal volume for subsequent tests of binding activity with human colorectal cancer tissues and cells in vitro using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemical staining. Specimens of gastric and esophageal carcinomas and normal intestinal mucosa, together with liver cancer cells and gastric cancer cells were utilized as control. Result The recombination rate of Fd and 袁 chain were 40% and 70% respectively, and the rate of their simultaneous insertion into Pcomb3 vector was 28%. The capacity of library for Fab fragment genes was 2.1伊10⁶, and the original antibody library screened with the 3 groups of mixed antigens were enriched to varied degrees, which all displayed relatively specific binding activity with human colorectal cancer tissue and cells in vitro. Conclusion Colorectal cancer-related antibody Fab fragments are obtained through screening phage display library, which show relatively specific binding activity with human colorectal cancer tissues and cells.

Key words: colorectal cancer, phage display library; expression, Fab fragment

噬菌体抗体库技术自 20 世纪 90 年代问世以来 袁使人源单抗的制备取得了突破性进展 遥利用该技术目前已筛选到众多人源性单抗 袁且大多与相关抗原具有较好的结合活性 袁对此国内外已有大量报道 遥利用大

肠癌组织及大肠癌细胞混和抗原蛋白质筛选针对人大肠癌组织的特异性多克隆抗体 袁国内报道不多 遥吴保平等^渊利用噬菌体抗体库技术构建了人大肠癌自然致敏淋巴结抗体 Fab 段噬菌体呈现库 袁并利用其致敏来源的 3 例大肠癌抗原及 LoVo 细胞初步筛选出了相关抗大肠癌抗体 遥本研究我们尝试用吴保平等构建的 Fab 基因库重新制备 Fab 段噬菌体原始库 袁并利用其致敏和非致敏来源的大肠癌组织及 3 种大肠癌

收稿日期 冤 002-01-28

基金项目 冤 广东省自然科学基金 (010643)

作者简介 冤 孙逊 渊971-冤 冤男 袁河北石家庄人 袁第一军医大学在读硕士研究生 袁电话 冤 20-61641544

细胞抗原对该库进行数轮筛选,对筛选结果亦进行初步鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及细胞株 阳性重组菌 XL1-blue-Pcomb3 为本所构建保存遥大肠癌 LoVo⁺HT-29⁺S-174T 细胞株⁺胃癌 MGC-803 细胞株⁺肝癌 HepG-2 细胞株⁺大肠杆菌 XL1-blue 均为本所冻存遥辅助噬菌体 VCSM13(Kana^r)为本所 4 益保存遥

1.1.2 标本 大肠癌 30 例⁺均为中高分化腺癌⁺胃癌 30 例⁺均为中高分化腺癌⁺食管癌 30 例⁺均为中高分化鳞癌⁺正常肠粘膜组织 30 例⁺均为手术切除的肠管远端切缘及活检取材证实为正常肠粘膜⁺南方医院 2000 年 9 月~2001 年 10 月活检及手术取材的标本⁺均经 HE 染色病理证实遥

1.1.3 主要试剂 PCR 扩增人抗体 Fab 段基因的引物设计根据文献⁺噬⁺菌⁺d 片段 5' 端引物为 p1⁺随⁺-CAGGTGCAGCTCGAGCAGTCTGGG-3'⁺毒⁺2⁺随⁺-GAGGTGCAGCTCGAGGAGTCTGGG-3'⁺日⁺ 端引物为 p3⁺随⁺-GCATGTACTAGT⁺TTTTGTCACAAGATTTGGG-3'⁺遥⁺K 链 5' 端引物为 p4 :5'-GACATCGAGCTCACCCAGTCTCCA-3' 和 p5:5'-GAAATTGAGCTCACGCAGTCTCCA-3'⁺袁⁺ 端引物为 p6:5'-GCGCCGTCTAGAACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCAAG-3'⁺遥⁺LB 培养基⁺袁⁺aq 酶⁺渊⁺华⁺美⁺袁⁺细胞裂解缓冲液⁺袁⁺EG8000⁺袁⁺洗脱液⁺袁⁺PTG⁺袁⁺-gal⁺袁⁺0.05mol/L 碳酸盐包被缓冲液⁺袁⁺生物素化羊抗人 IgG⁺渊⁺博士德⁺袁⁺MB 袁⁺酵母重组 HBsAg(rHBsAg)⁺袁⁺小鼠抗人 HBsAg⁺渊⁺博士德⁺袁⁺ABC 试剂盒⁺渊⁺博士德⁺袁⁺ABC-AP 试剂盒⁺渊⁺博士德⁺袁⁺遥

1.2 方法

1.2.1 鉴定 XL1-blue-Pcomb3 的 Fab 基因库库容 渊⁺冤 融化 XL1-blue-Pcomb3 后吸取 50 滋⁺加于 5ml LB 中⁺渊⁺et25 滋⁺/ml⁺冤⁺7 益⁺尧⁺00r/min 振荡培养 4~6h⁺袁⁺使其进入对数生长期遥渊⁺冤⁺将 XL1-blue-Pcomb3 加入 10ml 37 益⁺预温的 LB(50 滋⁺/ml Amp⁺袁⁺5 滋⁺/ml Tet⁺袁⁺中袁⁺混匀后取出 10 尧⁺尧⁺1 滋⁺分别用 100 滋⁺LB 稀释后袁⁺铺在固体 LB 平板上 渊⁺含 50 滋⁺/ml Amp⁺袁⁺5 滋⁺/ml Tet⁺袁⁺% IPTG⁺袁⁺.5mg/ml X-gal⁺袁⁺袁⁺涂匀袁⁺7 益⁺正放平皿 30min 后倒置培养过夜袁⁺计数白色菌落数遥渊⁺冤⁺挑取生长良好的白色菌落⁺加入 5ml LB 中(50 滋⁺/ml Amp⁺袁⁺5 滋⁺/ml Tet⁺袁⁺7 益⁺尧⁺00r/min 振荡培养 4~6h遥渊⁺冤⁺提取各单克隆菌落的质粒袁⁺法参见文献⁺噬⁺菌⁺渊⁺冤⁺PCR 扩增相应的 Fd 片段和 资⁺链⁺袁⁺反应体系为 50 滋⁺袁⁺由第渊⁺冤⁺步提取到的质粒 2 滋⁺袁⁺0 伊⁺uffer 5 滋⁺ 25mmol/L MgCl₂ 4 滋⁺袁⁺

10mmol/L dNTP1 滋⁺袁⁺以引物 p1⁺尧⁺2 和 p3 分别配对扩增重链 Fd 片段袁⁺4 尧⁺5 和 p6 分别配对扩增 资⁺链袁⁺由双蒸水补充到 49.0~49.5 滋⁺袁⁺物终浓度为 0.4~1.0 滋⁺/L 袁⁺5 益⁺预变性 10min 后袁⁺于 80 益⁺加入 Taq 酶 2.5U 袁⁺进行 PCR 反应遥循环参数为 94 益⁺变性 1min 袁⁺55 益⁺退火 1.5min 袁⁺2 益⁺延伸 2 min 袁⁺共 35 个循环日 PCR 产物 4 益⁺保存遥渊⁺冤⁺% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物遥

1.2.2 提取各组织和细胞的抗原 渊⁺冤⁺配制细胞裂解缓冲液袁⁺法参见文献⁺噬⁺菌⁺袁⁺而后冰水浴匀浆器和 PBS 液(0.01mol/L 袁⁺H7.4)遥渊⁺冤⁺取冻存的组织标本室温稍溶后袁⁺剪碎袁⁺液氮中研磨袁⁺将组织碎末加入裂解液中匀浆袁⁺冰浴 20min 遥渊⁺冤⁺到去细胞培养液袁⁺用冰预冷的 PBS 冲洗细胞 2 次袁⁺吸净 PBS 液后加入冰预冷裂解缓冲液 4 益⁺放置 20min 渊⁺渊⁺60ml 培养瓶约加 1ml 裂解液袁⁺袁⁺再用细胞刮刀刮细胞于培养瓶一侧遥渊⁺冤⁺将(2)尧⁺3) 步所得的组织和细胞裂解产物 4 益⁺尧⁺0000 r/min 离心 10min 遥(5)取上清袁⁺得组织和细胞蛋白袁⁺-70 益⁺冻存遥共提取了 3 例致敏大肠癌组织蛋白(等体积混和得 AgA)袁⁺3 例非致敏大肠癌组织蛋白(等体积混和得 AgB)袁⁺袁⁺种大肠癌细胞株蛋白(等体积混和得 AgC)袁⁺此外袁⁺还提取了其他数例大肠癌⁺胃癌⁺食管癌及正常肠粘膜组织袁⁺胃癌 MGC-803 细胞和肝癌 HepG-2 细胞抗原蛋白遥

1.2.3 表达大肠癌 Fab 段原始库及筛选该库 渊⁺冤⁺将 1.2.1 渊⁺冤⁺所得的约 15ml 菌液 37 益⁺尧⁺00r/min 振荡培养 1h 袁⁺加入 1 伊⁺0¹² pfu 辅噬菌体 VCSM131.5ml 超感染袁⁺混匀后混入 100 ml LB (Amp 50 滋⁺/ml 袁⁺et25 滋⁺/ml) 日⁺7 益⁺尧⁺00 r/min 振荡培养 2 h 袁⁺加 Kana 至 75 mg/L 日⁺7 益⁺尧⁺00 r/min 过夜遥渊⁺冤⁺次日晨 4 益⁺尧⁺000 r/min 离心 15 min 遥而后取上清加 PEG8000 及 NaCl 袁⁺使两者终浓度分别为 40g/L 和 30g/L 遥渊⁺冤⁺冰浴 30 min 使噬菌体沉淀袁⁺益⁺尧⁺000 r/min 离心 20 min 袁⁺弃上清袁⁺以 1% BSA/PBS 3ml 悬浮噬菌体沉淀使其充分溶解袁⁺益⁺尧⁺4000r/min 离心 5 min 袁⁺取上清即得 Fab 原始库日⁺益⁺保存遥渊⁺冤⁺取抗原 AgA 袁⁺0.05mol/L 碳酸盐缓冲液稀释到 300 滋⁺/ml 袁⁺每孔 200 滋⁺包被 ELISA 板袁⁺益⁺过夜遥吸去包被液袁⁺% BSA/PBS 37 益⁺封闭 1 h 遥吸去封闭液袁⁺加入 200 滋⁺噬菌体原始库袁⁺7 益⁺静置 2 h 遥吸去原始库袁⁺BST 洗涤渊⁺渊⁺1 次洗 1 次袁⁺第 2 次洗 5 次袁⁺第 3 次洗 10 次 冤⁺在无菌吸水纸上扣干孔中残液袁⁺加 200 滋⁺洗脱液室温静置 10 min 袁⁺袁⁺打吸出后立即加 8 滋⁺ 2 mol/L Tris 中和袁⁺而后加 5ml D₂₀₀=1 的 XLI-blue 袁⁺室温静置 15min 袁⁺加入 10ml 37 益⁺预温的 LB 袁⁺得 15ml 菌液袁⁺而后按照渊⁺冤⁺渊⁺冤⁺的步骤进行操作袁⁺得到次级抗体库可再进行下一轮的筛选袁⁺共

筛选 3 次得到 K_{A3} 同样用 Ag_B 和 Ag_C 进行筛选得到 K_{B3} 和 K_{C3} 将 K_{A3} 、 K_{B3} 和 K_{C3} 等体积混和得到 K_{mix} 。
 1.2.4 噬菌体抗体库滴度测定 噬菌体 1~10 噬抗体库用 LB 培养液稀释到适当浓度再取 100 噬稀释液与 100 噬 $D_{600}=1$ 的 XLI-blue 混和噬菌体在无茵试管中倒入约 4 ml LB 顶层培养基 噬 B 培养液加 0.6% 琼脂粉加入 4 噬 1 mol/L 的 IPTG 和 16 噬 50mg/ml 的 X-gal, 再与噬菌体中所得液体混和倒入 LB 底层琼脂上 噬 B 培养液加 1% 琼脂粉 噬转动使顶层分布均匀 噬 7 益培养箱中正放平皿 0.5 h 后倒置培养过夜 噬长出的噬斑数计数噬菌体滴度 噬

1.2.5 ELISA 鉴定抗体库 (1) 噬 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液稀释大肠癌 Ag 至 300 噬/ml 噬每孔 100 噬包被 ELISA 板 噬益过夜 噬吸去包被液 噬 BSA/PBS 37 益封闭 1 h 噬吸去封闭液, 加入 100 噬抗体库 K_{mix} 噬 7 益静置 2 h 噬吸去抗体液 噬 BST 洗涤 5 min 噬加入生物素化的兔抗人 IgG 和 SABC 噬每次用 PBST 洗涤 5 min 噬最后每孔加 100 噬 TMB 37 益显色 30 min 噬 0.1 mol/L H_2SO_4 25 噬中止显色 噬 D_{490} 噬共检测 20 例 噬同样方法检测胃癌 噬 0 例 噬食管癌 噬 0 例 噬正常肠粘膜组织 噬 0 例 噬 g 和 K 库的结合活性 噬检测大肠癌 LoVo 噬 HT-29 噬 S-174T 细胞 噬胃癌 MGC-803 细胞 噬肝癌 HepG-2 细胞和 K 库的结合活性 噬并取酵母重组 HBSAg 和小鼠抗人 HBSAg 做对照证明该检测系统的可靠性 噬

1.2.6 免疫组化鉴定抗体库 噬石蜡切片置于 55 益 ~60 益烤箱中烤 50 min 噬切片脱蜡至水 噬置新鲜配制 3% 的双氧水中 噬温 30 min 噬蒸馏水洗 噬微波修复及滴加抗原修复液 噬修复抗原 噬噬冻细胞切片常温融化 噬甲醇 - H_2O_2 室温浸泡 30 min 噬噬以 0.01 mol/L PBS 1 噬 0 稀释的正常兔血清封闭 噬温 20 min 噬滴加以 PBS 适当稀释 噬石蜡切片 < 1 噬 噬细胞切片 < 1 噬 0 噬的抗体库 噬益过夜 噬 0.01 mol/L PBS 洗 噬而后先后滴加生物素化兔抗人 IgG 及 SABC 工作液 噬均室温孵育 20 min 噬蒸馏水冲洗 噬 DAB 显色 噬木素复染 噬共检测大肠癌 噬胃癌 噬食管癌 噬正常肠粘膜组织各 30 例 噬阳性对照组以小鼠抗人 CEA 为一抗 噬阴性对照组以空噬菌体 VCSM13 为一抗 噬还设立了 HBV 感染的肝组织及小鼠抗人 HBSAg 做对照以证明该系统的可靠性 噬另应用 SABC-AP 试剂盒重复验证 噬

2 结果

2.1 Fab 段基因库库容鉴定

XLI-blue-Pcomb3 经复苏铺板后 噬可见到蓝白斑 噬其中 1 噬稀释后的平皿可见到约 500 个白斑 噬生长 噬表观库容为 $500 \times 5 \times 10^3 = 7.5 \times 10^6$ pfu (图 1) 噬提取 10 个白斑的质粒 噬在 2 个反应体系中经 噬链和 Fd

片段的引物分别行 PCR 噬 % 琼脂糖电泳 噬链体系可见到 7 条泳道有 700 bp 左右的扩增产物 噬图 2 Lane3~7,10,11 噬说明 噬链插入率约为 70% 噬 Fd 片段可见到 4 条泳道有 700 bp 左右的扩增产物 噬图 3 Lane3~5,8 噬说明 Fd 片段插入率约为 40% 噬同时含有 噬链和 Fd 基因片段的阳性菌约为 28% 噬 ab 段基因库实际库容约为 2.1×10^6 噬



图 1 阳性重组菌 XLI-blue-Pcomb3 复苏后铺板 (90cm 平皿)
 Fig.1 Planking of recombined positive bacterium XLI-blue-Pcomb3 after recovery (90cm petri dish)

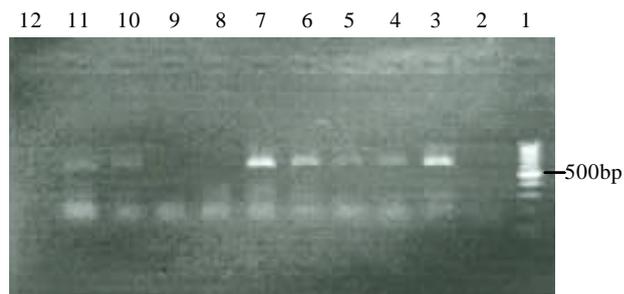


图 2 噬链 PCR 产物
 Fig.2 PCR product of phage chain
 Lane1: DNAMarker; Lane2-12: Identification of phage insert by PCR from plasmids of transformed E.coli

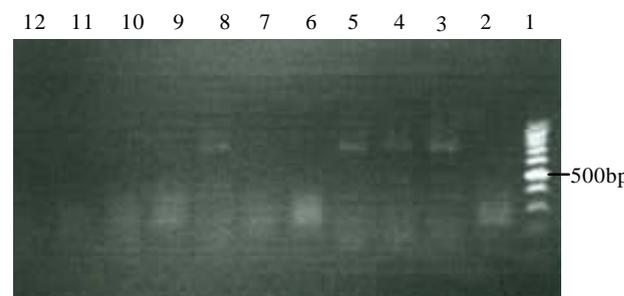


图 3 Fd 片段 PCR 产物
 Fig.3 PCR product of Fd fragment
 Lane1: DNAMarker; Lane2-12: Identification of Fd insert by PCR from plasmids of transformed E.coli

2.2 Fab 段噬菌体抗体库表达及筛选

向 Fab 段基因库中加入 10^{12} pfu 噬噬菌体 VCSM13 超感染后 噬得到含有噬菌体抗体的上清 噬经 PEG 沉淀浓缩后测滴度为 2.6×10^{12} cfu 噬分别用 3 组

混和抗原固相化后对抗体库进行了 3 轮淘选。尽管从第 1 轮到第 3 轮洗涤次数由 1 次增加到 5 次又增加到 10 次，但从固相洗脱下来的噬菌体滴度却显示了增加的趋势。其中以混和抗原 A(AgA)进行淘选增加的趋势最明显，约为 50 倍。这说明特异性噬菌体抗体的富集。表 1 示。

表 1 固相洗脱的噬菌体滴度的测定 (cfu/ml)

Tab.1 Determination of the titers of phages after elution (cfu)

ScreeningAg	Firstround	Secondround	Thirdround	Increased multiple
AgA	8.1E0 ³	1.2E0 ⁵	4.0E0 ⁵	50
AgB	6.5E0 ³	5.6E0 ⁴	1.1E0 ⁵	17
AgC	1.7E0 ⁴	9.3E0 ⁴	4.6E0 ⁵	27

2.3 噬菌体抗体库的鉴定

我们用 ELISA 法测定了噬菌体抗体库与人大

肠癌组织及细胞的结合活性。表 2 所示。表 2 显示 Kmix 与大肠癌组织的结合活性最高 ($D_{490}=1.075 \times 10^{-21}$)，与正常肠粘膜的结合活性最低 ($D_{490}=0.364 \times 10^{-16}$)。胃癌与食管癌结果相似，正常肠粘膜、胃癌、食管癌与大肠癌的 D_{490} 均有显著性差异 ($P < 0.01$)。表 3 显示 Kmix 与 3 种大肠癌细胞均具有较高的结合活性，而与胃癌、肝癌则结合活性较低 ($P < 0.01$)。免疫组化染色显示抗体库与大肠癌的染色阳性率最高，为 36.7% (11/30)。阳性染色的切片可见到癌细胞胞浆、胞膜呈棕黄色着色。图 4 示胃癌 (0/30)、食管癌 (0/30)、正常肠粘膜 (0/30) 则未见阳性着色。细胞涂片染色显示 LoVo 细胞为阳性。图 5 示 DAB 棕黄色。图 6 示 CIP/NBT 紫蓝色。癌细胞胞浆、胞膜着色。胃癌 MGC-803 细胞及肝癌 HepG-2 细胞呈阴性反应。

表 2 噬菌体抗体库与各种组织结合活性的 ELISA 检测

Tab.2 Binding of phage antibody library with various tissues assayed by ELISA

First antibody	Antigen D_{490} (Mean±SD)					rHBsAg
	Colorectal cancer	Gastric cancer	Esophageal cancer	Normalintestinal mucosa		
Kmix	1.075E-21	0.562E-21*	0.591E-31*	0.364E-16*	0.233E-02*	
Anti-HBs	0.203E-08*	0.238E-09	0.221E-09	0.255E-13	1.276E-01	

* $P < 0.01$ vs colorectal cancer; * $P < 0.01$ vs colorectal cancer

表 3 噬菌体抗体库与各种细胞结合活性的 ELISA 检测

Tab.3 Binding of phage antibody library with various cells assayed by ELISA

First antibody	Antigen D_{490} (Mean±SD)					rHBsAg
	LoVo	HT-29	LS-174T	MGC-803	HepG-2	
Kmix	0.879E-12	0.506E-06	0.607E-18	0.333E-06*	0.290E-05*	0.355E-01*
Anti-HBs	0.264E-03#	0.233E-04#	0.247E-03#	0.298E-03	0.250E-06	1.266E-06

* $P < 0.01$ vs LoVo or HT-29 or LS-174T; # $P < 0.01$ vs LoVo or HT-29 or LS-174T of Kmix



图 4 大肠癌组织免疫组化染色阳性 (SABC, 100)

Fig.4 Positive colorectal cancer tissue after immunohistochemical staining (SABC, 100)

图 5 大肠癌 LoVo 细胞免疫组化染色阳性 (SABC, 100)

Fig.5 Positive LoVo cells after immunohistochemical staining (SABC, 100)

图 6 大肠癌 LoVo 细胞免疫组化染色阳性 (SABC-AP, 100)

Fig.6 Positive LoVo cells after immunohistochemical staining (SABC-AP, 100)

3 讨论

阳性重组菌 XL1-blue-Pcomb3 的构建参见文献^[1]。利用 琢互补现象^[2] Ilmann 等^[3] 我们首先对复苏的 XL1-blue-Pcomb3 进行了鉴定^[4] 带有重组质粒的细菌形成白色菌落^[5] 而不带的则形成蓝色菌落^[6] 这样就较容易地筛选到了可能含有重组质粒的菌落^[7] PCR 鉴定显示 Fab 基因库容量为 2.1伊0⁶^[8] 国外应用同样方法构建的文库容量约在 1伊0⁶~1伊0⁷ 范围^[9] 国内约在 1伊0⁶ 左右^[10] 利用该基因库我们表达出了 Fab 噬菌体原始库^[11]

Fab 基因库来自 3 例大肠癌病人的转移淋巴结^[12] 其致敏抗原为该 3 例病人的大肠癌抗原蛋白质^[13] 该基因库中还含有针对其他抗原的基因^[14] 我们利用该 3 例病人的癌组织提取蛋白固相化后进行筛选^[15] 为了能筛选到更多的大肠癌相关抗体以增加库容^[16] 我们还提取了数例非致敏大肠癌抗原蛋白质及 3 种大肠癌细胞抗原进行固相化筛选^[17] 目前所见报道多为利用纯化的可溶性单抗对抗体库进行筛选^[18] 用可溶性多克隆混合肿瘤相关抗原蛋白固相化筛选多克隆肿瘤相关抗体^[19] 国内报道不多^[20] 足够的抗原量在此筛选过程中是重要因素^[21] 检测结果表明利用致敏大肠癌组织提取到的可溶性抗原蛋白筛选使噬菌体库富集程度最大^[22] 其他 2 组也得到了富集^[23] 将 3 组混合抗原筛选后得到的 3 个三级库混合以增加该库的库容^[24] 使其尽可能地包含大肠癌相关抗体^[25] ELISA 检测结果表明筛选后的抗体库能较特异性地与大肠癌组织和细胞结合^[26] 免疫组化鉴定时^[27] 我们的反复实验^[28] 发现主要存在两个问题^[29] 一是除部分大肠癌细胞胞浆^[30] 胞膜呈棕黄色着色外^[31] 还有很多标本包括大肠癌^[32] 癌管癌^[33] 的癌组织间质及少量正常肠粘膜腺腔以外的组织间质也见着色^[34] 或两者兼有^[35] 二是染色的结果不稳定^[36] 同一个标本阳性染色部位时隐时现^[37] 经多次检测无法确定其是否阳性^[38] 考虑我们将间质着色及结果不稳定的标本剔除^[39] 这部分约占各类癌组织的 20%~30%^[40] 正常组织的 5%~10%^[41] 得到一个较客观的结果^[42] 我们发现胃癌^[43] 食管癌^[44] 正常肠粘膜无一阳性^[45] 而大肠癌有 30% 多的阳性率^[46] 细胞扒片染色用了 2 种染色系统^[47] 均显示 LoVo 细胞为阳性^[48] 胃癌 MGC-803 细胞及肝癌 HepG-2 细胞阴性^[49] 且 Kmix 滴度达到 1伊0¹⁰^[50]

目前单链抗体^[51] 抗体 Fab 段等小分子抗体用于肿瘤免疫诊治的研究方兴未艾^[52] 但仍存在明显不足^[53] 得到足够数量和质量的抗体用于临床技术上仍未完全解决^[54] 抗体的免疫原性依然是临床应用的主要障碍^[55] 解决这一问题的主要途径是抗体的人源化及制备人源抗体^[56] 噬菌体抗体库技术可直接制备人源抗体并从中筛选出高亲和力克隆^[57] 研究证实^[58] 正常组织癌

变时癌基因发生突变的随机性引起异常蛋白的随机性出现^[59] 因而导致肿瘤特异性抗原的个体独特性^[60] 无法产生特定针对某一类肿瘤的抗原^[61] 动物实验也表明肿瘤特异性抗原是个体独特的^[62] 即不同个体在同一致癌因素诱发的同一组织学类型的肿瘤有不同的特异性抗原^[63] 所以^[64] 我们只能寄希望于利用某一类肿瘤的相关性抗原筛选其相关性抗体^[65] 肿瘤相关抗原同时存在于肿瘤细胞和正常细胞的表面^[66] 且在肿瘤的生长过程中^[67] 具有较强抗原性的亚克隆被免疫系统消灭^[68] 而无抗原性或抗原性较弱的亚克隆则生长为肿瘤^[69] 而肿瘤组织抗原性一般较弱^[70] 这样就会导致利用大肠癌相关抗原筛选相关抗体有一定的难度^[71] ELISA 的结果也显示了 Kmix 与大肠癌^[72] 癌管癌^[73] 有一定的交叉反应性^[74] 解决的方法之一是使抗体库具有足够大的库容和利用多种肿瘤相关抗原反复淘选扩增^[75] 我们在设计引物时考虑了其 H 链^[76] 链 cDNA 的匹配情况^[77] 使其尽可能地扩增出全套免疫球蛋白的可变区基因^[78] 把不同来源的 Fd 段和 链等体积混和以期增加库容^[79] 合并多种来源的大肠癌相关抗原反复筛选^[80] 这样我们利用噬菌体抗体库筛选到了与大肠癌较特异性结合的多克隆抗体群^[81] 比单一抗大肠癌抗体更具免疫诊治的优势^[82]

近年来^[83] 利用肿瘤标志物靶向免疫诊治大肠癌的研究开展较多^[84] CEA 依然是研究的重点^[85] 很多学者构建抗 CEA 的双特异性抗体^[86] 使其具有将毒素^[87] 放射性核素标记的二价半抗原^[88] 免疫效应细胞^[89] 前体药物酶^[90] 等靶向 CEA 阳性的肿瘤细胞的作用^[91] 肿瘤相关抗原 LEA 对高分化大肠癌也具有较高特异性^[92] 可能成为对大肠癌早期诊断有实用价值的肿瘤标志物^[93] 另外^[94] 对于 CA19-9^[95] A72-4^[96] A50^[97] 组织多肽抗原^[98] AP^[99] 铁蛋白等及组织酶标志物^[100] 也进行了研究^[101] 但目前肿瘤标志物对大肠癌尚缺乏敏感性和特异性^[102] 其中任何一种肿瘤标志物均不能确定诊断^[103] 临床上多采用多种肿瘤标志物联合筛检大肠癌^[104] 于此^[105] 我们利用噬菌体抗体库筛选的大肠癌多克隆抗体群在利用多种肿瘤标志物联合筛检大肠癌方面也许是一个尝试^[106]

参考文献

咱哲 吴保平, 张亚历, 肖冰, 等. 人源性大肠癌自然致敏噬菌体抗体 Fab 呈现库的构建与筛选^[1] 第一军医大学学报, 2001, 21(4): 270-4.

WuBP, ZhangYL, XiaoB, et al. Construction and screening of natural immune Fab antibody phage library from patients with colorectal cancer^[2] FirstMilMedUniv, 2001, 21(4): 270-4.

咱哲 SambrookJ, FritschE, ManiatisT, 著. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南^[3] 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1995. 19-22, 57-8, 872.

咱暂 陈竟华,王 琰,刘群英,等.人源性噬菌体抗体库的构建及HBsAg 人单抗的筛选 咱暂 中华微生物和免疫学杂志,1995,15(3):158-62.

ChenJH,WangY,LiuQY, et al. CloningofhumanMcAbagainst HBsAgfromphageantibAylibrary咱暂ChinJMicrobiolImmunol,1995,15(3):158-62.

咱暂 赵云峰,王海涛,王全立,等.噬菌体抗体库的构建及人源性抗 HIV-1gp160 抗体的筛选 咱暂 中国生物化学和分子生物学报,1998,14(1):20-4.

ZhaoYF, WangHT,WangQL, et al. Screeningof"1F7"idiotypic Anti-gp160antibodiesfrom phage antibody library 咱暂 Chin J BiochemMoleculBiol,1998,14(1):20-4.

咱暂 王 琰,化 冰,刘群英,等.随机化 CD3 抗体库的构建及不经免疫制备抗体的初步探讨咱暂中华微生物和免疫学杂志,1997,17(6):449-52.

WangY, HuaB, LiuQY, et al. By-passing immunization: ConstructionofaphageantibodylibrarywithrandomizedCD3咱暂Chin JMicrobiolImmunol,1997,17(6):449-52.

咱暂 张广发,王 琰,王雅明,等.噬菌体抗体库的构建及抗肿瘤单抗的筛选咱暂中华肿瘤杂志,1995,17(4):258-63.

ZhangGF,WangY,WangYM, et al. Cloningofanti-breastcancer monoclonalantibodiesfromphageantibodylibraries 咱暂 ChinJ Oncol,1995,17(4):258-63.

咱暂 杨光华,李甘地.肿瘤咱暂见:武忠弼.病理学咱暂第 4 版,北京:人民卫生出版社,1996.163.

咱暂 张 弘,迟景宏.血清糖类蛋白 50 对消化道恶性肿瘤的诊断价值咱暂医师进修杂志,1997,20(12):645-6.

咱暂 王怀志,吴金生,赖大年,等.血清 CEA 尧A242 测定在大肠癌诊断中的应用评价咱暂中国现代医学杂志1998,8(3):10-1.

咱0暂许庆文,李岩松,朱荷根.大肠癌 P53 蛋白 PCNA 和 CEA 的表达与淋巴结转移的关系咱暂世界华人消化杂志,1998,6(3):244-6.

XuQW,LiYS,ZhuHG.RelationbetweenexpressionP53protein PCNAandCEAincolorectal cancerandlymphnodemetastasis咱暂 WorldJGastroenterol,1998,6(3):244-6.

咱1暂FengS,SongJD.Determinationof 茁glucuronidaseinhumancolo-rectalcarcinomacelllines咱暂ChinNatI Gastroenterol,1997,3(4):251-2.

咱2暂HuJY, SuJZ, Pi ZM, et al. Radioimmunoimagingof colorectal cancer using ^{99m}Tc labeled monoclonal antibody 咱暂 World J Gastro-enterol,1998,4(4):303-6.

咱3暂ZhouZF,YuanSZ.Prognosticvalueofsilverstainednucleolarorganizerregionsincolorectalcarcinoma咱暂ChinNatI NewGastroenterol,1995,1(1):43-7.

咱4暂FordCH,OsbornePA,RegoBG, et al. Bispecificantibodytargeting of doxorubicin to carcinoembryonic antigen-expressing colon cancer celllines in vitro and in vivo咱暂 IntJCancer,2001,92(6):851-5.

咱5暂GestinJF,LoussouarnA,BardiesM, et al. Two-steptargetingof xenograftedcoloncancerusingabispecificantibodyand188Re-labeledbivalenthapten:biodistributionanddosimetrystudies 咱暂 J NuclMed,2001,42(1):146-53.

咱6暂GautherotE, RouvierE, DanielL, et al. Pretargetedradioimmunotherapyofhumancolorectalxenograftswithbispecificantibodyand ¹³¹I-labeledbivalenthapten咱暂NuclMed,2000,41(3):480-7.

咱7暂NolanKF, YunCO,AkamatsuY, et al. Bypassingimmunization: optimized designof"designer T cells" against carcinoembryonic antigen(CEA)-expressingtumors,andlackofsuppressionbysoluble CEA咱暂ClinCancerRes,1999,5(12):3928-41.

咱8暂BhatiaJ,SharmaSK,ChesterKA, et al. Catalyticactivityofan in vivo tumor targetedanti-CEA scFv: carboxypeptidase G2fusion protein咱暂IntJCancer,2000,85(4):571-7.

咱9暂徐延豪,宋今丹.肿瘤相关抗原 LEA 在大肠癌前病变及早期肠癌诊断中应用的研究咱暂世界华人消化杂志,1999,7(11):992-5.

咱0暂姜春英,丁 克,刘贤锡,等.大肠癌组织酶标志物研究咱暂中国中西医结合外科杂志,1998,4(6):336-9.

JiangCY, DingK,LiuXX, et al. Studyontheenzymemarkersin colorectalcancertissues 咱暂 ZhongguoZhongxixiyiJieheWaike Zazhi,1998,4(6):336-9.

责任编辑 隋金星 冤

征订咱医学综述曳

咱医学综述曳是卫生部主管的国家级期刊,具有力量雄厚而庞大的编委会阵容,自 1994 年创刊以来,得到了广大读渊冤者的热心支持,深受数百万读者的喜爱,更为众多作者荣升高级职称而庆幸,为了更快尧广泛地介绍世界医学前沿最新进展信息,本刊于 2003 年由月刊改为半月刊,全年 24 期,大 16 开,封皮以进口铜版纸彩色印刷,内文纸为 80 g 双胶,国内外公开发行,全国各邮局渊冤均可订阅。

主要栏目:分子生物医学尧遗传学尧免疫学尧流行病学尧影像学尧兼症医学及传统分类的心血管尧呼吸尧消化尧内分泌尧神经精神及肿瘤尧血液病等系统,是医学校尧科研院所尧硕士尧博士研究生和临床医务工作者发表学术见解和学术研究成果及探讨医学进展的极佳园地,遥创建理论综述版和临床实践版遥

邮发代号 晓-106

联系地址 晓天津医科大学第二医院咱医学综述曳 晓00211 冤

电话 晓22-86316418

010-69514263

E-mail:yxzs@btamail.net.cn

大鼠纹状体边缘区和海马的功能联系研究

宁 群 舒斯云 鲍新民 第一军医大学神经科学研究所 广东 广州 510282 宛

摘要目的 研究纹状体边缘区与具学习记忆功能的重要脑区——海马之间是否存在功能联系。方法 用神经系功能活动形态定位法将低浓度的海人藻酸作为化学刺激剂注射于大鼠海马。采用免疫组化法观察 c-fos 原癌基因在脑内的表达。结果 c-Fos 在海马杏仁核、纹状体床核、大脑皮层等部位有强烈表达。在纹状体中 c-Fos 表达成条带状集中分布在边缘区。而在尾壳核和苍白球少有表达。结论 海马与纹状体边缘区存在密切的功能联系。

关键词 海马;纹状体边缘区;学习记忆

中图分类号 R338.26 文献标识码 文章编号 000-2588(2002)08-0684-03

Functional connection between the marginal division and hippocampus in rats

NING Qun, SHU Si-yun, BAO Xin-min

Institute for Neuroscience, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To investigate the functional connection between the marginal division of the striatum and hippocampus, a brain region that plays a vital role in learning and memory. Methods Morphological localization of functional activity of the nervous system was employed. Kainic acid (0.01%) was stereotaxically injected into the hippocampus as a chemical stimulus, and immunohistochemistry method was used to show the expression of c-Fos in rat brain. Results c-Fos was intensely expressed in the hippocampus, amygdaloid nucleus, the bed nucleus of the striatum and cerebral cortex; in the striatum, a stretch in the marginal division where c-Fos-positive nuclei congregated was observed, while c-Fos expression was scarcely detectable in the caudate putamen and globus pallidus. Conclusion Functional connection exists between the marginal division and hippocampus in rats.

Key words: hippocampus; marginal division; the striatum; learning and memory

海马是学习记忆中非常重要的脑区。无论从临床观察以及损毁海马后对学习记忆的影响，还是从学习记忆的海马电图、神经元的电活动，都说明海马在学习记忆中具有重要作用。纹状体边缘区是我们在纹状体内发现的一个与学习记忆有关的脑区。为研究这两个具学习记忆功能的脑区之间是否存在功能联系，我们用神经系功能活动形态定位的方法研究海马与边缘区的功能联系。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

雄性 SD 大鼠 16 只，体重 220~250g，购自第一军医大学实验动物中心。用标准大鼠饲料喂养。用自来水随机分为两组：实验组 10 只，对照组 6 只。

1.2 立体定向注射

大鼠腹腔内注射 10% 水合氯醛 0.5ml/kg s.p.w. 麻醉后，固定在立体定位仪上。参照包新民等^[1]方法，选用前凶定位坐标系，确定背侧海马注射点为 AP=B-2.0mm，MLP 为距前凶点的前后距

离，为前凶点 ML=依 2mm，ML 为距前凶点的左右距离，H=3.5mm。为以脑表面为基准的深度。切开皮肤，用牙钻在选定位点钻开颅骨，打开硬脑膜。以直径为 20μm 的微玻管向海马内注射 0.01% 海人藻酸 0.2μl，留针 15min，拔出微玻管，缝合切口。置于动物室常规喂养。对照组用同上的方法注射生理盐水 0.2μl。

1.3 免疫组化

动物存活 8 h 后灌注取材。先经升主动脉灌注生理盐水 200ml，再灌注 4% 多聚甲醛。上海溶剂厂 400ml，透取脑后置于 30% 蔗糖。州试剂厂 400ml，益过夜。冰冻冠状切片，厚 35μm。透免疫组化步骤如下：1. 3% Triton-100 浸 1h。2. 正常羊血清 (博士德公司) 30min。3. 室温透兔抗 fos 抗体 (NCSTAR 公司 1:1000) 益 24 h。4. 透生物素标记的羊抗兔 IgG 透 2h。5. 益过夜。6. 透兔 B 复合物透 2h。7. 透 2h。8. 透各步骤间以 0.01mol/L H7.4 磷酸盐缓冲液冲洗。透葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍胺 DN 显色反应。透切片经裱片、脱水、透明、封片后显微镜下观察。透照相透取一套切片用正常羊血清代替抗 fos 抗体，透进行上述免疫组化反应做阴性对照。

Nissle 染色。透每一个标本取一套切片，透作 Nissle 染色，透确定针道位置。

收稿日期 002-01-16

基金项目 国家自然科学基金 9770250 宛 广东省自然科学基金 9050 宛

作者简介 宁 群 966 宛 男 湖南邵阳人 第一军医大学在读博士研究生 电话 20-61643276

2 结果

c-Fos 阳性表达为紫黑色或紫蓝色圆形颗粒。实验组 10 例在海马、中央杏仁核、终纹床核、大脑皮层、纹状体、室周、纹状核等脑区均可见大量密集的 c-Fos 表达。在纹状体中 c-Fos 阳性细胞的分布呈带状，集中在边缘区内。而在纹状

体的尾壳核和苍白球少有阳性细胞。图 1C 见 6 例在丘脑网状核壳外侧背核可见 c-Fos 表达。图 1E 见 1 例在内侧杏仁核有少量表达。

对照组实验结果：抗体空白对照组未见 c-Fos 表达。生理盐水对照组仅在注射区附近有少量 c-Fos 表达。其他部位未见表达。

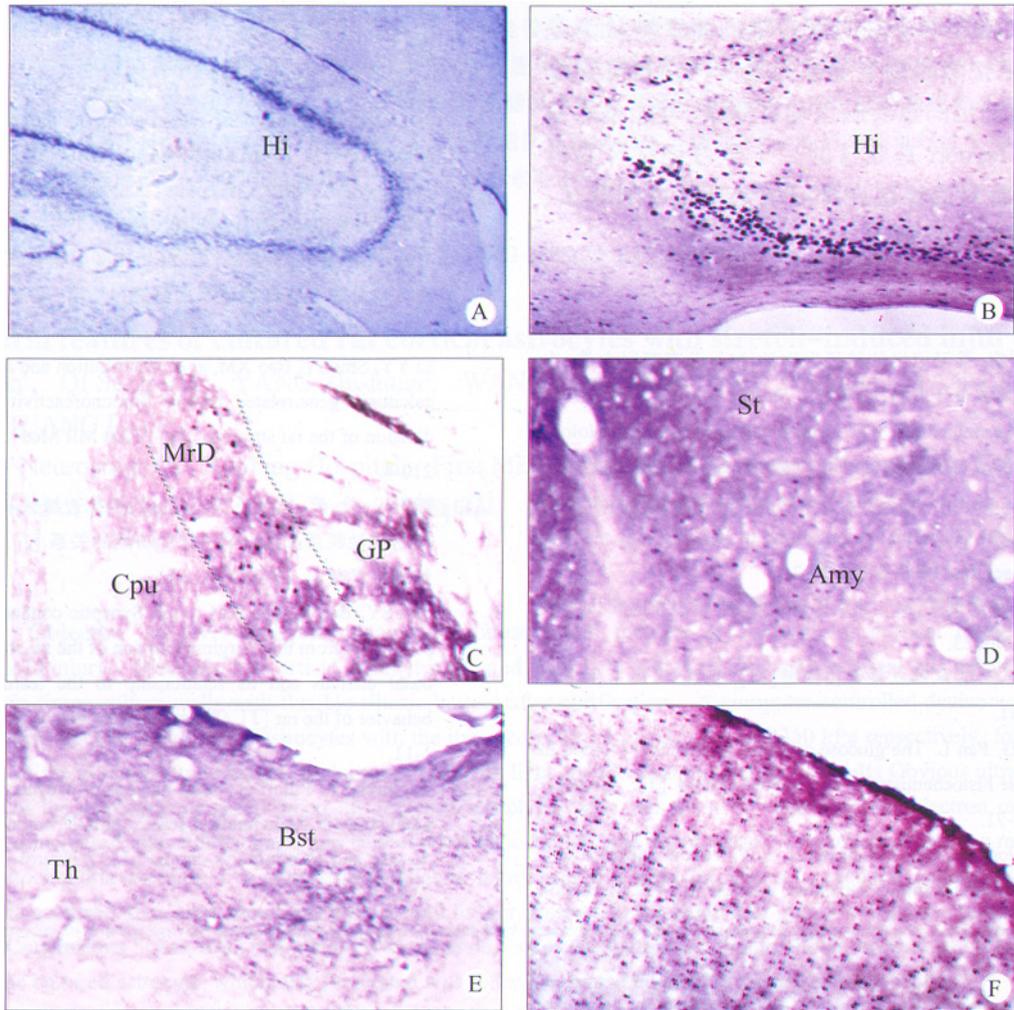


图 1 海人枣酸注射到海马后 c-Fos 蛋白在大鼠脑内的表达

Fig.1 Expression of c-Fos protein in rat brain after kainic acid injection into the hippocampus

A: Injection sites shown by the Nissl staining (伊0); B: c-Fos expression in the hippocampus (Hi) (伊00); C: c-Fos expression in the striatum (伊00). c-Fos expression is mainly confined in the marginal division (MrD), and is scarcely detected in the caudate putamen (Cpu) and globus pallidus (GP); D: c-Fos expression in the amygdala nucleus (Amy); E: c-Fos expression in the bed nucleus of the striatum terminals (Bst) (伊00), Th: thalamus; F: c-Fos expression in the cortex

3 讨论

c-Fos 是神经元活动时最早激活的转录因子。由于 c-Fos 仅在和受刺激的神经元有功能联系的神经元中表达，所以 c-Fos 表达已成为研究神经元功能联系的解剖学工具。本实验将海人藻酸注射到海马作为化学性刺激信号，发现纹状体边缘区及杏仁核等边缘系统结构有强 c-Fos 表达，说明海马与边缘区及边缘系统有密切的功能联系。

海马、杏仁核、终纹床核等属边缘系统。其间的联

系已被证实。杏仁核的纤维通过终纹投射到终纹床核。杏仁核与海马通过杏仁核海马移行区相连。本实验结果在证实海马与边缘系统其他区的功能联系的同时，还新发现了海马与边缘区的功能联系。我们曾在损毁边缘区后检测海马的长时程增强。TP 发现 LTP 随时间而逐渐衰减。而 LTP 被认为是学习记忆基础的突触可塑性机制之一。这说明边缘区对海马的学习记忆功能有一定影响。

我们既往研究显示边缘区的降钙素基因相关肽

纤维在腹侧与中央杏仁核相连,在背侧延续至终纹床核,这说明边缘区与上述两脑区有直接的纤维联系。应用神经束路追踪法和免疫电镜显示边缘区与 Meynert 基底核有纤维突触联系和功能联系,而损毁这种联系,动物的学习记忆有明显下降。因此,边缘区与边缘系统和 Meynert 基底核均有密切的联系。边缘系统具有学习记忆的重要功能,而 Meynert 基底核变性导致的大脑皮层乙酰胆碱纤维的减少被认为是 Alzheimer 病记忆障碍的重要原因之一。由此可见边缘区与参与学习记忆的重要脑区均有联系,可能是联系边缘系统和 Meynert 基底核的一个学习记忆环路的枢纽。我们将对边缘区在学习记忆环路中的联系和作用地位作进一步研究。

参考文献

- 咱暂 韩太真, 吴馥梅. 学习记忆的神经生物学. 咱暂北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1997. 174-203.
- 咱暂 Levitan IB, Kaczmarek LK. The Neuron cell and molecular biology [M]. 2nd ed. New York: Oxford University Press Inc, 1997. 447-81.
- 咱暂 Shu SY, Bao XM, Li SX, et al. A new subdivision of mammalian neostriatum with functional implications to learning and memory. 咱暂 J Neurosci Res, 1999, 57(6): 1-12.
- 咱暂 韩济生. 神经科学纲要. 咱暂北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1996. 23.
- 咱暂 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱. 咱暂北京: 人民卫生出版社, 1991. 1-41.
- 咱暂 Shu SY, Ju G, Fan L. The glucose oxidase-DAB-Nickel method in the peroxidase histochemistry of the nervous system. 咱暂 Neurosci Lett, 85: 169-71.
- 咱暂 Panagis G, Nomikos GG, Miliareisis E, et al. Ventral pallidum self-stimulation induces stimulus dependent increase in c-fos expression in reward-related brain regions. 咱暂 Neuroscience, 1997, 77(1): 175-86.
- 咱暂 Heimer L. Human brain and spinal cord. 咱暂 New York: Springer-Verlag Press, 1995. 353-67.
- 咱暂 Sun N, Roberts L, Cassel MD. Rat central amygdaloid nucleus projection to the bed nucleus of the striatum terminalis. 咱暂 Brain Res Bull, 1991, 27(5): 651-8.
- 咱暂 王均, 舒斯云, 包新民, 等. 海人枣酸损毁大鼠纹状体边缘区后对海马长时程增强的影响. 咱暂第一军医大学学报, 2002, 22: 132-6.
- Wang J, Shu SY, Bao XM, et al. Effects of kainic acid that damages the marginal division of rat striatum on hippocampal long-term potentiation. 咱暂 First Mil Med Univ, 2002, 22: 32-6.
- 咱暂 Collinger GL. NMDA receptors--their role in long-term potentiation. 咱暂 Trends Neurosci, 1987, 10: 288-93.
- 咱暂 李耀宇, 舒斯云, 包新民, 等. 降钙素基因相关肽在大鼠纹状体边缘区内分布及其纤维联系的研究. 咱暂第一军医大学学报, 1999, 19: 201-4.
- Li YY, Shu SY, Bao XM, et al. Distribution and fiber connection of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the marginal division of the rat striatum. 咱暂 First Mil Med Univ, 1999, 19(3): 210-4.
- 咱暂 舒斯云, 包新民, 等. 大鼠纹状体边缘区与 Meynert 氏基底核的突触联系及其与学习记忆功能的关系. 咱暂中国组织化学与细胞化学杂志, 1998, 7(1): 1-11.
- Shu SY, Bao R, Bao XM, et al. Synaptic connections between the projection from the marginal division of the striatum to the Meynert basal nucleus and its relationship to the learning and memory behavior of the rat. 咱暂 Chinese J Histochem Cytochem, 1998, 7(1): 1-11.
- 咱暂 Tagliavini F, Pilleri G. Basal nucleus of Meynert. A neuropathological study in Alzheimer's disease, simple senile dementia, Pick's disease and Huntington's chorea. 咱暂 J Neurol Sci, 1983, 48(2): 216-21.

可延缓亨廷顿舞蹈症发作的胆汁酸

美国研究人员最近找到一条治疗亨廷顿舞蹈症的新线索。他们通过小鼠实验发现,一种胆汁酸能有效减轻这一疾病对脑神经细胞的损伤。

明尼苏达大学基恩等人在新一期美国科学院院刊上介绍,在实验中,他们选择了一组携带亨廷顿舞蹈症致病基因且呈现发病症状的病鼠和一组健康鼠进行对比测试。研究人员先给一半病鼠注射了牛磺熊脱氧胆酸 (UDCA),然后再让注射了这种胆汁酸的病鼠接受注射的病鼠以及正常的实验鼠分别参加了走迷宫测试。结果显示,接受胆汁酸注射治疗的病鼠比未接受注射病鼠的能力强一半,且与健康鼠几乎没有区别。大脑检查还发现,注射了胆汁酸的病鼠脑神经细胞死亡数比未接受注射的病鼠明显要少。

亨廷顿舞蹈症具有遗传性,主要由一个变异基因引起。该变异基因携带者在全球人口中约占万分之一。这种疾病会逐步损耗患者的脑神经细胞,导致患者个性、情绪和智力等出现异常。随着病情不断加重,患者有可能在 10 至 25 年内死亡。

亨廷顿舞蹈症目前尚无有效的治疗方法,但目前已可以在胎儿出生前检测其体内是否携带导致该病的变异基因。基恩指出,如果今后研究能证明胆汁酸疗法对人体也适用,且可以在患者年幼时对其脑神经细胞死亡起预防作用,那么将有可能实现对亨廷顿舞蹈病患者的终身防治。但他也表示,目前离这一目标还很遥远。在开始人体临床试验前,尚需大量研究工作。

培养大鼠星形胶质细胞牵张损伤后超微结构的变化

王克万¹ 袁松涛¹ 袁志焕² 袁正国² 袁佩芳² 袁开军¹ 袁承勇¹ 袁理金¹ 渊第一军医大学南方医院神经外科袁广东 广州 510515 日第三军医大学大坪医院交通医学研究所袁重庆 400042 冤

摘要 目的 研究体外培养星形细胞牵张损伤后超微结构的变化遥方法 取新生 1~2 d 大鼠的皮层细胞原代培养 袁纯化后传代培养于乳胶膜培养皿中遥采用计算机控制的牵张损伤装置袁分别以 50 尧50 尧50 kPa 压力牵张损伤培养于乳胶膜上的大鼠皮层星形胶质细胞遥用 3% 戊二醛固定后袁扫描电镜和透射电镜观察遥结果 当用 50 kPa 驱动压力进行牵张损伤时袁细胞结构即有明显破坏袁表现为细胞间隙增宽袁部分胞体和突起被撕裂袁以 50 kPa 牵张损伤后 1 h 袁透射电镜下可见线粒体肿胀 尧减少 尧损伤后 6 h 可见线粒体致密 尧胞器减少等遥当牵张应力增大 袁星形细胞损伤程度加重 袁胞器明显减少 袁线粒体空泡化 尧微管明显减少 袁甚至水样胞质或致密胞体遥结论 较小的应力即可致星形细胞紧密连接的破坏和超微结构的改变袁能与脑外伤后产生广泛的脑水肿有关遥

关键词 细胞培养 星形细胞 神经胶质 牵张损伤

中图分类号 329.24 文献标识码 文章编号 000-2588(2002)08-0687-04

Ultrastructural features of cultured rat cortical astrocytes with stretch-induced injury

WANG Ke-wan¹, QI Song-tao¹, YANG Zhi-huan², WANG Zheng-guo², ZHU Pei-fang², YANG Kai-jun¹, LIU Cheng-yong¹, HUANG Li-jin¹

¹Department of Neurosurgery, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;

²Research Institute of Traffic Medicine, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Abstract: Objective To investigate the changes of ultrastructural features of cultured rat cortical astrocytes after stretch-induced injury. Methods Rat cortical astrocytes isolated from 1-to-2-day-old rats were cultured till confluency, and then plated in tissue culture wells with flexible silastic bottom after purification. A computer-controlled device was used to produce stretch-induced injury in the astrocytes with the imposed pressure of 50, 150, and 250 kPa respectively, followed by observation of the ultrastructural changes in the astrocytes with light and electron microscopy. Results Obvious ultrastructural destruction of the astrocytes occurred when the imposed stretch pressure was 50 kPa, and scanning electron microscopy demonstrated increased intercellular space and laceration of the cell body and its processes. Transmission electron microscopy revealed mitochondria swelling 1 h after stretch-induced injury and 6 h after the injury, vacuolar degeneration of the mitochondria occurred. Increased stretch pressure caused further decrease in the amount of glial filaments and densification of astrocytes. Conclusions Stress, even at a relatively small scale, can cause disruption of intercellular junction and ultrastructural change of the cultured astrocyte, which may be related with extensive brain edema after traumatic brain injury.

Key words: cells, cultured; astrocytes; neuroglia; stretch induced injury

星形胶质细胞是中枢神经系统中数量最多的细胞袁对维持脑内微环境的稳定及神经元功能有重要作用遥近年研究表明袁损伤后星形细胞比神经元更易产生应激反应袁并可产生多种引起神经元继发损伤的毒性物质袁损伤后星形细胞的变化可能比神经元更为明显遥因此袁本实验利用体外培养星形细胞牵张损伤模型袁研究体外培养星形细胞在不同程度下牵张损伤后超微结构的变化并探讨其意义遥

1 材料与方

收稿日期 002-01-25

基金项目 国家自然科学基金重点项目 9630330 冤

作者简介 王克万 渊964- 冤 辽宁海城人 袁 999 年毕业于第三军医大学袁博士袁讲师袁主治医师袁主要从事继发性脑损伤研究袁电话 20-61641803

1.1 实验动物 试剂及主要设备

新生 1~3 d 的 Wistar 大鼠由第三军医大学大坪医院动物中心提供遥 DMEM 尧 12 尧 新生牛血清购自美国 Gibco 公司袁 胶膜培养皿为美国 Flexcell 公司产品袁 多功能小型生物撞击机由第三军医大学野战外科研究所四室研制遥

1.2 大鼠皮层星形胶质细胞的培养 纯化与鉴定

根据文献 咱 的方法并进行改良袁 取出出生后 1~3 d 的 Wistar 大鼠袁 无菌条件下取脑袁 在解剖显微镜下仔细去除脑膜及血管组织袁 剪碎后用 0.125% 胰蛋白酶 37 益消化 15 min 袁 用含血清培养基终止消化遥 分散细胞后先行贴壁处理袁 以去除纤维细胞袁 然后以 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 细胞接种于底面积为 75 cm² 的塑料培养瓶中遥 培养基为 DF 渊 DMEM:F12=1:1 冤 加 10% 新生牛

血清遥生长 8~10d 待细胞融合后袁置于 37 益摇床中袁 250r/mim 14~16h 袁以去除少突胶质细胞和小胶质细胞遥然后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代遥接种于直径为 35 mm 的 6 孔硅胶膜培养板中袁每皿细胞数为 2伊 10⁵ 遥待细胞生长融合后进行实验遥

传代的细胞接种于 18mm伊8mm 盖玻片上袁生长 3~4d 后袁用 4% 多聚甲醛固定遥按照文献咱咱的方法用兔抗胶质纤维酸性蛋白抗体免疫组化渊P 法袁染色袁鉴定培养细胞的性质遥

1.3 培养细胞牵张损伤方法

根据文献咱咱的方法进行遥牵张损伤装置由 586 计算机尧空气压缩机尧氮气瓶尧电磁阀尧气体导管和损伤头组成遥在致伤前吸除培养皿中的培养液袁即与牵张损伤器相连并保持密封袁用计算机控制驱动压力袁分别以 50尧50尧50kPa 牵张损伤细胞遥

1.4 扫描电镜和透射电镜标本的制作

牵张损伤后的细胞及正常未牵张的细胞袁即用 PBS 洗涤后袁加入 3% 戊二醛原位固定袁常规制作扫描电镜标本遥另取正常和按上述致伤后的细胞袁分别于 1尧尧 h 用 0.25% 胰酶消化后离心袁去除上清袁加 3% 戊二醛固定后袁于 10% 蔗糖磷酸盐缓冲液中过夜袁再用 1% 锇酸固定 1 h袁丙酮常规脱水袁不氧树脂 618 包埋袁超薄切片袁透射电镜观察遥

2 结果

2.1 光镜下观察

原代培养星形细胞胞体较大袁突起较长袁生长至 8~10d 后融合袁融合后的细胞在底层生长袁在相差显微镜下已看不到突起遥少突胶质细胞则生长在星形细胞的表层袁胞体较小袁突起细小袁分枝较多遥经纯化传代后袁星形细胞分裂速度比少突胶质细胞快袁融合后用胶质纤维酸性蛋白染色鉴定表明星形细胞可达 96% 以上遥牵张损伤后袁融合的星形细胞间出现间隙袁随着驱动压力的增加细胞间空隙增大袁当压力达 250 kPa 以上袁培养皿中心几乎无融合细胞袁但细胞仍附着于硅胶膜培养皿上并不脱落遥在损伤最重的中心部位袁无明显的活细胞袁遗留的少量细胞明显肿胀变性遥

2.2 扫描电镜观察

扫描电镜可见生长融合的细胞之间连接紧密袁间隙很小 渊图 1 冤遥当用 50kPa 驱动压力进行牵张损伤时袁细胞结构即有明显破坏袁表现为细胞间隙增宽袁胞体和突起被撕裂 渊图 2 冤遥随着压力增大袁细胞破坏加重遥当以 250kPa 牵张损伤时袁可见绝大部分细胞被损伤袁胞体和突起明显断裂袁细胞间几乎没有连接存在遥

2.3 透射电镜观察

培养细胞绝大多数为星形细胞遥正常星形细胞结构完整袁可见细胞间正常连接 渊图 3 冤袁有大量微丝尧微

管 渊图 4 冤遥在以 250kPa 牵张损伤后 1 h 透射电镜下可见细胞正常连接破坏袁线粒体嵴减少袁细胞致密 渊图 5 冤遥损伤后 6 h 可见线粒体致密尧细胞器减少等改变遥当牵张应力增大袁牵张损伤的胶质细胞表现为细胞器明显减少袁线粒体空泡化袁微丝尧微管明显减少 渊图 6 冤遥直至细胞质空泡化尧水样胞质或致密胞体等遥

3 讨论

在中枢神经系统创伤研究中袁由于体外研究模型能排除体内损伤过程中各种复杂因素的作用袁并能区分原发性损伤和继发性损伤的细胞以及观察单因素对某种细胞的影响袁近年来体外培养细胞损伤模型日益引起人们的重视遥在颅脑外伤中袁脑组织除了在损伤瞬间经受压力改变之外袁牵张变形产生的应力在损伤机制中起着相当重要的作用遥培养细胞牵张损伤模型可较接近地模拟在体创伤过程中细胞受压尧牵张变形的应力变化袁稳定地复制体外培养细胞牵张损伤袁同时具有损伤范围广尧可控制损伤程度尧重复性好等特点袁为研究颅脑损伤的病理机制和药物作用提供了一个有用手段遥星形细胞培养易存活袁分裂增殖迅速袁易于纯化袁二代和三代细胞在功能上无明显改变袁而且易于贴壁袁牵张后不脱落袁损伤后的细胞和死亡的细胞有修复尧再生能力袁是研究体外创伤较理想的细胞遥

本研究结果表明袁使用不同的牵张压力可引起乳胶膜不同程度的牵张变形袁并可导致培养的星形细胞不同程度的损伤遥随着牵张压力的增加袁乳胶膜变形增大袁损伤程度也随之加重袁牵张压力和损伤程度明显相关袁可通过控制牵张压力来调节损伤程度遥在星形细胞牵张损伤后扫描电镜的研究中可见袁较小的牵张应力就可导致星形细胞的紧密连接破坏袁细胞间隙增大袁随着牵张应力的增大袁可出现星形细胞突起断裂袁甚至胞体撕裂等严重的病理改变遥这种由于较小的应力即可致星形细胞紧密连接破坏的现象袁可能与临床脑外伤后血脑屏障破坏产生广泛的脑水肿有关遥

由于神经元突起较长袁在各种应力作用下容易受损袁以往创伤的研究多集中于神经元袁对星形细胞在创伤早期的病理变化研究较少遥近年研究表明袁在脑组织受到病理损伤的早期袁星形细胞即产生反应袁出现胶质纤维酸性蛋白大量增生 渊图 7 冤遥星形胶质细胞参与了脑内的应激反应和脑水肿的过程袁星形细胞比神经元更易受到损伤遥 Ahmed 等 渊图 8 冤体外牵张损伤研究显示袁轻度和中度牵张损伤培养星形细胞后 15min 袁线粒体功能即显著下降袁胞内 ATP 含量下降 43%~52% 曰在纯化的培养神经元牵张损伤后袁又有重度损伤才出现线粒体功能变化袁但 ATP 含量无改变 曰但在混合培养的神经元和胶质细胞牵张损伤后袁轻尧中和重度损

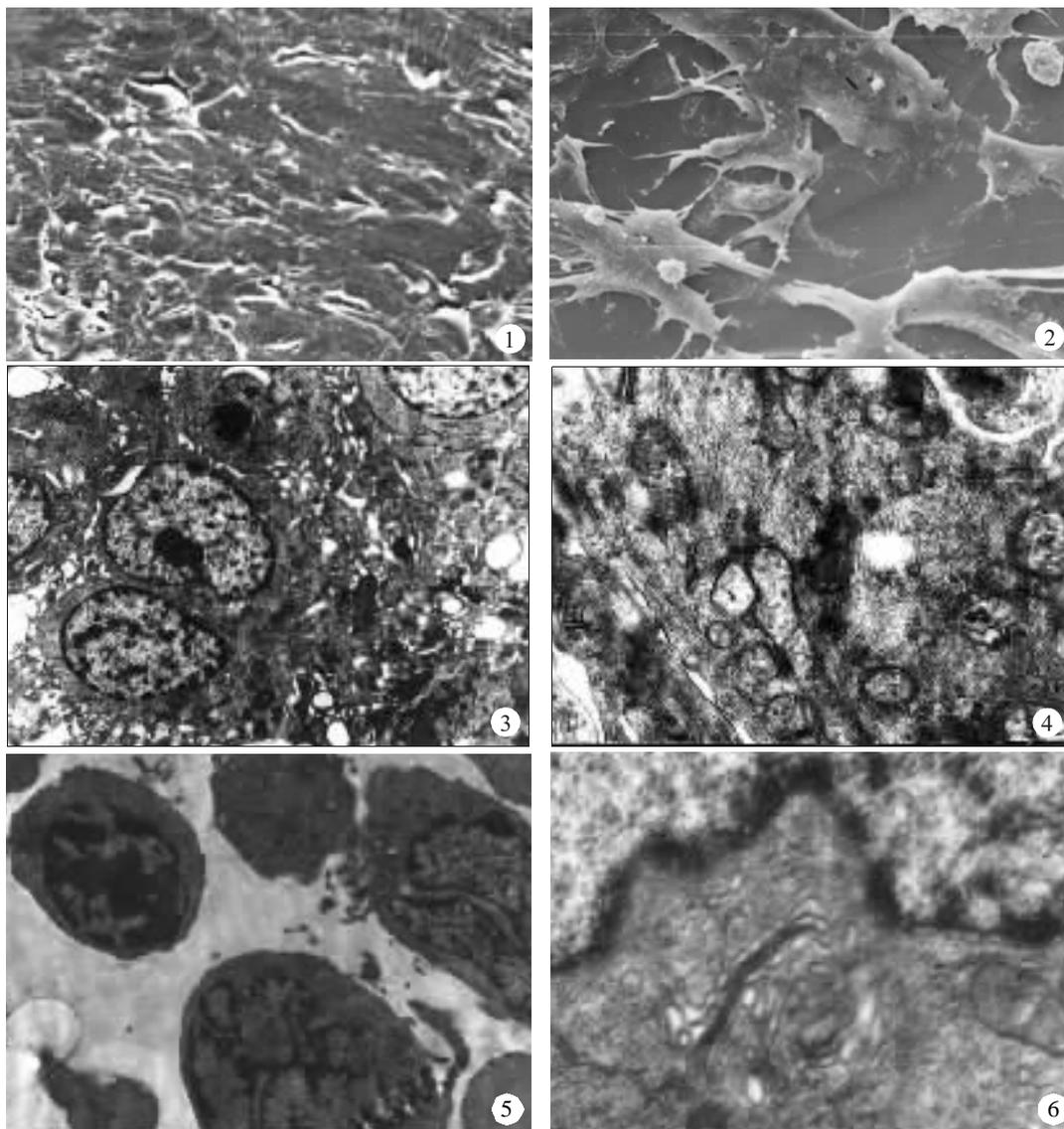


图 1 正常生长融合的培养星形细胞扫描电镜 3000 倍
 Fig.1 Confluent astrocyte cultured in wells with silastic bottoms (SEM, 3000)
 图 2 50kPa 牵张压力损伤后的星形细胞扫描电镜 3000 倍
 Fig.2 Astrocytes after injury by stretch pressure of 50 kPa (SEM, 3000)
 The cell body and processes of the astrocytes are disrupted
 图 3 正常培养星形细胞超微结构透射电镜 3000 倍
 Fig.3 Normal ultrastructure of cultured astrocytes (TEM, 3000)
 The intercellular junction of cultured astrocytes is shown
 图 4 正常培养星形细胞超微结构透射电镜 20000 倍
 Fig.4 Normal ultrastructure of cultured astrocytes (TEM, 20000)
 Numerous glial filaments and microtubules are seen in the cultured astrocytes
 图 5 250kPa 牵张压力损伤后星形细胞超微结构透射电镜 3000 倍
 Fig.5 Ultrastructure of astrocytes after injury by stretch pressure of 250 kPa (TEM, 3000)
 Cell body densification and disruption of intercellular junction are seen
 图 6 250kPa 牵张压力损伤后星形细胞超微结构透射电镜 20000 倍
 Fig.6 Ultrastructure of astrocytes after injury by stretch pressure of 250 kPa (TEM, 20000)
 The mitochondrial densification and decrease of glial filaments and microtubule can be seen

伤都可造成混合培养细胞中神经元线粒体功能下降衰
 同时 ATP 含量下降 22%~28% 结果表明牵张损伤可
 导致星形细胞线粒体功能损害星形细胞损伤后可引
 起局部神经元功能变化 本研究结果也显示牵张损

伤后早期星形胶质细胞超微结构即发生变化在星形
 细胞牵张损伤的早期表细胞线粒体的嵴即明显减少衰
 表明细胞能量代谢受到明显影响随着损伤的加重衰
 转 696 页 完

一株输血传播病毒新变种的克隆和序列分析

刘志华 袁抗先 袁海棠 第一军医大学南方医院感染内科 广东 广州 510515 袁

摘要目的 从 1 例不明原因转氨酶升高的病人血清中克隆输血传播病毒 TTV 的 DNA 袁并进行序列分析遥方法 用巢式 PCR 扩增 TTV DNA 长片段袁连接至 pGEM-T 载体上袁挑选一个克隆 6-B 进行测序遥将 56-B 与 GenBank 中五株 TTV 进行氨基酸和核苷酸序列的同源性分析袁并用最大似然法进行分子进化分析遥结果 56-B 株与 TA278 等五株 TTV 序列的核苷酸同源性分别为 42.4% 袁 48.2% 袁 47.9% 袁 49.8% 袁 61.7% 袁氨基酸序列的同源性更低袁但其 5' 和 3' 两端非编码区的序列仍然很保守遥结论 56-B 株与其他 TTV 株之间的同源性很低袁有很高的基因异质性袁是 TT 的一个新变种袁代表 TTV 的一个新的基因型遥

关键词输血传播病毒 基因异质性 巢式 PCR

中图分类号 院 78 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588(2002)08-0690-03

Cloning and sequence analysis of a novel TT virus variant

LIU Zhi-hua, LUOKang-xian, HEHai-tang

Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To clone the DNA of a TT virus (TTV) variant isolated from a patient with elevated alanine transaminase (ALT) of unknown etiology, and conduct sequence analysis. Methods The long fragment of TTV DNA was amplified by nested PCR and then cloned into pGEM-T vector. A clone named 56-B containing 3.2 kb TTV DNA was selected for sequence analysis besides homology analysis with other 5 TTV variants retrieved from GenBank, and phylogenetic analysis was carried out by maximum likelihood method. Results The nucleotide identities of 56-B with the other 5 TTV strains TA278, JA10, US35, SANBAN and TUS01 were 42.4%, 48.2%, 47.9%, 49.8% and 61.7% respectively, and the corresponding amino acid identities were even lower. Phylogenetic analysis showed that 56-B was far from other TTV strains in genetic distance that ranged from 0.344 to 0.458. However, these sequences in the 5'- and 3'-end were still much conservative. Conclusion The isolated 56-B showed high heterogeneity in genetic background and was therefore quite distinct from other TTV strains as a novel TTV variant that represents a new TTV genotype.

Key words: transfusion transmitted virus; genetic heterogeneity; nested polymerase chain reaction

输血传播病毒 渊ansfusion transmitted virus, TTV 袁是日本学者 Nishizawa 渊于 1997 年用代表性差异分析法 渊DA 袁从一例输血后肝炎病人血中发现的一种新病毒 袁并认为与不明原因输血后肝炎有关遥 1999 年 Miyata 渊和 Mushahwar 渊两个研究小组都证实 TTV 为一单链负股环型的 DNA 病毒 袁全长 3852 个核苷酸 袁认为是人类第一个圆环病毒 遥随后袁 TTV 原始株 TA278 有很大差异的 TTV 新变种如 SANBAN 渊袁 US01 渊袁 LMV 渊等不断被发现 遥为了获取更多的 TTV 序列信息以分析其基因异质性 袁我们在一名不明原因单项转氨酶升高的患者血清中克隆出一株 TTV 序列 袁与现有 TTV 分离株的序列有较大差异 袁是一株 TTV 新变种 遥

1.1.1 标本 血清标本取自本室随访的一名不明原因单项转氨酶升高的病人 遥该病例谷丙转氨酶间歇升高 袁 ELISA 法检测其血清中甲 尧 尧 尧 尧 型肝炎标志物 袁包括抗 -HAV IgM, HBsAg 袁抗 -HCV 袁抗 -HEV IgM 等均为阴性 遥

1.1.2 引物 根据文献 渊报道 袁选择 TTV 保守区引物 袁由上海生工生物工程公司合成 遥引物序列如下 院外引物 T1 渊义链 袁 5'-AGTGCACTTCCGAATGGCTG-3' 渊t 95~114 袁 渊反链 袁 5'-GAAGATAAAGGCCTTATGGCG-3' 渊t 3380~3360 袁 渊内引物 T2 渊义链 袁 5'-GAGTTTTCCACGCCCGTCCG-3' (nt 114~133), T46 渊反链 袁 5'-GTCTGGCCCCACTCACTTTCG-3' 渊nt 3357~3337 袁 渊

1.1.3 巢式 PCR 反应 第一轮 PCR 取 5 滋 DNA 袁 滋 10 伊 Buffer 袁 滋 dNTP 渊 0 mmol/L 袁 渊外引物 50 pmol 袁 2 U Taq DNA 聚合酶 渊 akara, Dalian, China 袁 渊加无菌水至 50 滋 反应体积 遥 PCR 循环程序 院 4 益 袁 0 s 曰 55 益 袁 0 s 曰 2 益 袁 min 袁 0 个循环后 袁 2 益 延伸 5 min 遥 第二轮 PCR 取 2 滋 第一轮 PCR 产物 袁 加内引物 50 pmol 袁 渊同第一轮 遥

1 材料与方 法

1.1 TTV 长片段的扩增

收稿日期 院 002-03-16

基金项目 院 院队九五医药卫生科 研基金 渊 8z073 袁

作者简介 院 刘志华 渊 971- 袁 袁 袁 山东莱阳人 袁 现为第一军医大学在读博士 袁 袁 袁 电话 院 20-61641888-87314

1.1.4 PCR 产物的电泳回收 取第二轮 PCR 产物 20 μ l 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳将 3.2kbDNA 条带从凝胶上切下来用少量胶回收试剂盒 Watson 回收操作按说明书进行

1.2 克隆测序

将回收后的 PCR 产物克隆到 pGEM-T(Promega, Madison, WI)载体上转化大肠杆菌 JM-109 感受态细胞接种到含 ampicillin/IPTG/X-gal 的 LB 平板上从白色菌落中筛选出阳性克隆用 Watson 小量质粒提取试剂盒提取质粒进行测序测序仪为 ABI PRISM377

1.3 序列分析

核苷酸序列分析用 DNASIS 软件 Hitachi Version 7.0 使用 Homology Analysis 程序对各条序列进行最大同源性分析氨基酸序列分析采用 PROSIS Hitachi Version 5.0 软件先用 DNASIS 软件将核苷酸序列翻译为氨基酸序列再用 PROSIS 中的 Homology Analysis 程序进行同源性比较进化树分析采用 CLUSTALW(EMBL, Version 1.74)软件先用其中的 Multiple Alignment 程序将所有序列对齐再用 Phylogenetictree 程序计算遗传距离并进行进化分析用 Bootstrap 程序计算 Bootstrap 值进化树用 Treeview 软件观看在 Internet 上用 BLAST 程序在 GenBank 中搜索与之有同源性的序列用 BANKIT 程序申请序列登录号

2 结果

2.1 TTV 长片段的克隆和测序

用巢式 PCR 法从 1 名患者血清中扩增出了 3 200 bp 的 PCR 产物克隆至 pGEM-T 载体上挑取 1 个克隆 56-B 进行测序将测序得到的 56-B 克隆的

核苷酸序列用 BLAST 程序在 GenBank 中进行同源搜索结果表明除 TTV 外无任何与其有显著同源性的序列而且仅在其 3' 端有部分序列与 TTV 有同源性而在中间的大部分序列与 TTV 无明显同源性

2.2 核苷酸和氨基酸同源性分析

为了分析 56-B 与其他 TTV 序列的相似程度从 GenBank 中调出 TUS01, SANBAN 以及 Genotype1 类型的全序列或近似全序列 TA278, JA10, US35 共 5 条序列与 56-B 进行比较核苷酸分析结果表明 56-B 与其他序列的同源性都比较低分别为 42.4%, 48.2%, 7.9%, 9.8% 和 61.7% 其中与 SANBAN 的同源性最高但在不同区域同源性亦有所不同(表 1) 56-B 的 3' 和 5' 两个末端 200bp 左右的区域与其他 TTV 序列有较高的同源性分别为 89.5%~92.7% 和 69.7%~95.0% (表 1) 而中间的大部分同源性都很低特别是 nt1400~1650 之间为 44.1%~49.7% 氨基酸同源性分析显示 56-B 的 ORF1 与其他序列的同源性都比较低介于 28.0%~36.7% 之间 ORF2 的同源性在 24.4%~43.1% 之间 56-B 的 ORF1 和 ORF2 与 SANBAN 的同源性最高分别为 36.7% 和 43.2% 具体结果见表 2

表 1 56-B 与五株 TTV 在不同区域的核苷酸序列同源性比较
Tab.1 Homology analysis between 56-B and the 5 TTV isolates in different regions

	56-B		
	nt1-150	nt1400-1650	nt2940-3220
US35	89.5	48.9	94.2
JA10	89.6	47.2	89.0
TA287	89.6	48.2	79.2
SANBAN	92.7	44.1	69.7
TUS01	91.6	49.7	95.0

表 2 56-B 株与五株 TTV 的核苷酸及氨基酸同源性比较 (%)
Tab.2 Homology analysis between 56-B and the 5 TTV variants (%)

		TA287	JA10	US35	TUS01	SANBAN	56-B
TA287	ORF1		72.0	73.7	55.7	49.6	42.4
	ORF2						
JA10	ORF1	67.6		72.6	48.7	48.4	48.2
	ORF2	49.3					
US35	ORF1	69.1	69.1		50.9	48.8	47.9
	ORF2	47.3	48.3	35.8			
TUS01	ORF1	37.2	38.4	35.8		55.3	49.8
	ORF2	38.8	36.3	36.9			
SANBAN	ORF1	36.1	36.1	35.6	52.9		61.7
	ORF2	39.7	34.4	40.4	35.6		
56-B	ORF1	28.0	30.5	28.5	32.9	36.7	
	ORF2	24.4	25.3	29.7	37.3	43.1	

2.3 进化树分析

将 56-B 株与 GenBank 中 TUS01, SANBAN 尧

TA278, JA10, US35, A1, A2B 和 GH1 等八株 TTV 全序列或近似全序列共同进行进化分析结果表明

56-B与已知 TTV 基因型的遗传距离都比较远袁范围在 0.344~0.458 之间袁不能归为任何一个基因型袁是 TTV 的一个新变种渊图 1冤遥

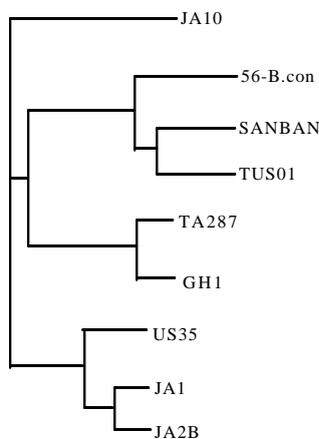


图 1 9 株 TTV 序列的系统进化树分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of 9 TTV strains

2.4 GenBank 登记

在 Internet 上用 BANKIT 程序进行序列登记袁 56-B 的登录号是 AF371370遥

3 讨论

自发现 TTV 以来袁各国学者从病原学尧流行病学尧临床等方面进行了广泛的研究袁虽然有很多进展袁但 TTV 的致病性尚无定论遥值得指出的是袁目前各国学者在 TTV 致病性的研究中袁都是根据 Okamoto 的 TA278 序列设计引物进行检测的遥因此根据现在的研究结果袁只能认为 TTV1a 型与不明原因肝炎无关遥 Okamoto 等学者的研究表明 TTV 基因组具有极高的异质性袁至少可分 16 种基因型遥 Khudyakov 的研究又把 TTV 分为 5 个基因群袁因为不同基因群之间的差异已经超过了基因型的范围袁其中的一个基因群包括了以往发现的 TTV 各基因型袁该基因群与另外的 4 个基因群显著不同袁并且这 4 个基因群之间彼此也有很大差别袁作者认为这 4 个新的基因群是密切相关而又明显不同的类 TTV 病毒渊TV-like冤遥由此可见袁众多密切相关又显著不同的 TTV 基因群袁基因型和亚型构成了一个庞大的 TTV 家族袁这个家族的新的成员正在不断地被发现遥在如此庞大的家族中袁是否有一株或几株与不明原因肝炎有关袁值得进一步深入研究遥

为了获得 TTV 更多的核苷酸序列信息袁我们采用从 TTV 5' 和 3' 非编码区设计的引物经 PCR 扩增从一病例血清中得到了 56-B 克隆遥有趣的是袁测序结果表明袁这个克隆的序列与已知的任何 TTV 序列的同源性都比较低遥进化分析的结果表明袁 56-B 与其他 8 株 TTV 序列的进化距离在 0.344~0.458 之间袁与 SANBAN 的进化关系最近袁遗传距离也已达到了

0.344遥根据文献报道袁遗传距离在 0~0.34 之间为不同的 TTV 毒株袁在 0.34~0.80 之间为不同的基因型遥因此袁本文中的 56-B 株代表一个不同于已知的 TTV 基因型的新基因型遥从我们的研究结果来看袁在我国人群中应该还有未被发现的 TTV 的新基因型存在袁这些 TTV 毒株与已知的 TTV 毒株之间的进化关系及其致病意义有待于进一步研究遥虽然 56-B 与其他 TTV 毒株的序列很低袁但在其 3' 和 5' 端非编码区 200bp 左右区域有很高的同源性袁表明非编码区在病毒进化过程中非常保守袁可能与病毒的复制等重要功能有关遥其编码区的基因异质性很大袁特别是 nt 1400~1650 这一区域袁编码区的高度异质性可能是 TTV 在长期进化过程中与宿主相互适应袁逃避宿主免疫监视的结果遥

TTV 是一种异质性很大并且种类很多的 DNA 病毒袁因此研究 TTV 的致病性需要有很多的 TTV 序列的资料遥国外已报道多株 TTV 新变种遥国内尚未见报道遥本文报道的 56-B 是 TTV 的新变种袁代表 TTV 家族的一个新基因型袁其与不明原因单项转氨酶升高的关系尚需通过流行病学研究加以明确遥

参考文献

咱暂 Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, et al. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241: 92-7.

咱暂 Miyata H, Tsunoda H, Kazi A, et al. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *Virology*, 1999, 73: 3582-6.

咱暂 Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, et al. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3177-82.

咱暂 Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology*, 1999, 260: 17-22.

咱暂 Okamoto H, Nishizawa T, Ukita M, et al. The entire nucleotide sequence of a TT virus isolate from the United States (TUS01): comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. *Virology*, 1999, 259: 437-48.

咱暂 Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, et al. Identification of a new human DNA virus (TTV-like minivirus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol*, 2000, 145: 979-93.

咱暂 Hijikata M, Iwata K, Ohata Y, et al. Genotypes of TT virus (TTV) compared between liver disease patients and healthy individuals using a new PCR system capable of differentiating Ia and Ib types from mothers. *Arch Virol*, 2000, 144: 2345-54.

咱暂 Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, et al. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology*, 1999, 259: 428-36.

咱暂 Khudyakov YE, Cong M, Nichols B, et al. Sequence heterogeneity of TT virus and closely related viruses. *Virology*, 2000, 74: 2990-3000.

日本血吸虫新基因腺苷酸激酶基因的发现与克隆

彭鸿娟¹ 陈晓光¹ 卢晓昭² 袁龙紫新¹ 第一军医大学寄生虫学教研室 广东 广州 510515 第一军医大学学员一旅五队 广东 广州 510515

摘要 目的 将用表达序列标签 (expression sequence tag, EST) 策略及同源性搜索发现的日本血吸虫新基因腺苷酸激酶 (adenylate kinase, AK) cDNA 克隆到表达质粒 pET32a(+) 上, 为下一步研究该基因的功能做准备。方法 将插入于 pTriplEx2 质粒上的 cDNA 进行测序, 用 BLASTn 程序搜索测序结果, 根据表达质粒 pET32a(+) 上的克隆位点及该 cDNA 序列设计 PCR 引物, 将 PCR 产物纯化后连接到 pMD18-T 载体上, 将重组 T 载体经 EcoRI 和 XhoI 双酶切后切下的 Sjak 基因导入原核可溶性表达质粒 pET32a(+) 中。结果 本研究所发现的新基因与曼氏血吸虫 AK 基因的同源性达 86%。结论 PCR 产物的片段长度与预期大小一致, 重组 T 载体及表达质粒经 EcoRI 及 XhoI 双酶切后证明具有与目标片段长度相符的插入片段。结论 发现日本血吸虫的 cDNA 与曼氏血吸虫 AK cDNA 高度同源, 并且成功地构建出重组表达质粒 pET32a(+)-Sjak。

关键词 日本血吸虫; 曼氏血吸虫; 腺苷酸激酶

中图分类号 R382.24; Q78 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2002)08-0693-04

Identification and cloning of adenylate kinase gene, a novel gene of *Schistosoma japonicum*

PENG Hong-juan¹, CHEN Xiao-guang², LU Xiao-zhao³, LONG Qing-xin¹

¹Department of Parasitology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Fifth Corps, First Cadet Brigade, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To subclone a novel gene of *Schistosoma japonicum* (Sj), adenylate kinase (AK) cDNA, which was identified through expressed sequence tag (EST) strategy and homology search, so as to prepare for further functional study of this gene. Method The inserted cDNA fragment was sequenced and searched with BLASTn program. Two PCR primers were designed according to the sequence of this Sjak cDNA and the cloning sites in pET32a(+) plasmid, with the product purified before ligation with pMD18-T vector. The recombinant T-vector was digested with EcoRI and XhoI to obtain Sjak cDNA, which was then introduced into the expression plasmid pET32a(+). Results The novel gene possessed 86% homology with Sm AK cDNA, and the PCR product is of expected length. Double digestion with EcoRI and XhoI proved that the recombinant T-vector and the expression plasmid had the insert with length identical to that of the target fragment. Conclusion The novel cDNA codes for adenylate kinase of *Schistosoma japonicum*, and the recombinant expression plasmid pET32a(+)-Sjak have been successfully constructed.

Key words: *Schistosoma japonicum*; *Schistosoma mansoni*; adenylate kinase

日本血吸虫病是亚洲国家的一种重要的寄生虫病, 特别是中国的一些地区及菲律宾群岛。据估计, 目前在我国有 8 个省 127 个县, 至少有 2200 万人受血吸虫病的威胁。当前血吸虫病控制受到以下因素的阻碍: 治疗方法、毒性行政管理、抗药性等。限制因素: 频繁的重叠感染; 疫苗研制的前景不容乐观。缺少对血吸虫许多生物学知识的了解。为了寻找新的治疗药物及疫苗, 血吸虫病的研究转向了对血吸虫基础知识及其分子生物学的研究。血吸虫基因组计划 (schistosoma genome project, SGP) 的主要目标之一

是发现与鉴定日本血吸虫与曼氏血吸虫的新基因, 从而寻找新的治疗药物与疫苗。表达序列标签 (expression sequence tag, EST) 可用于利用生物学数据库进行 DNA 或蛋白质的同源性分析, 从而研究这些基因的起源及功能推测。我们在国内外首次构建了日本血吸虫尾蚴 cDNA 文库, 并用 EST 策略从文库中筛选到一个包含完整开放读码框的 cDNA 序列, 与曼氏血吸虫腺核苷单磷酸激酶 (adenylate kinase, AK) mRNA 序列同源性达 86%。

1 材料与方法

1.1 质粒

含日本血吸虫腺苷酸激酶 (Sjak) cDNA 的原始克隆是用 EST 策略从日本血吸虫尾蚴 cDNA 文库中随机筛选到的。该 cDNA 片段所插入的载体为 pTriplEx2 噬菌体, 侵染 BM25.8 大肠杆菌后, 自行环化为

收稿日期 2002-02-09

基金项目 联合国发展开发署 / 世界银行 / 世界卫生组织热带病研究和培训特别规划署基金 (A00690, A00191)

作者简介 彭鸿娟 (1973-) 女, 江西上饶人, 中山大学生命科学学院博士研究生, 第一军医大学寄生虫学教研室讲师, 电话 20-61640114-89122, e-mail: Floriapeng@hotmail.com

TriplEx2质粒袁该质粒具有氨苄抗体筛选标记遥原核表达质粒 pET32a(+)由中山大学中山医学院病原生物学教研室吴忠道博士惠赠遥pMD18-Tvector 购自宝生物工程大连有限公司遥

1.2 工具酶和试剂

Taq 酶尧NTP尧Xho I尧EcoR I 购自广州基因公司袁 DNAMarker 购自上海博彩科技有限公司遥

1.3 测序及同源性搜索

测序由上海基康生物技术有限公司完成遥 同源性搜索由以下网址上的 BLASTn 软件完成渊http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast 冤遥

1.4 引物设计

根据 SjAKcDNA 序列袁包含从 ATG 至 TAA 为止的全编码区袁用 DNAMAN 软件设计引物遥引物合成由上海博彩生物科技有限公司完成遥P1院ATGAATTCATGACAGATCAAAAAGTTA3袁在 5' 端引入 EcoR 玉酶切位点及保护碱基 P2: 5'TACTCGAGAAGAAG AAGTGA3'袁在 5' 端引入 Xho 玉酶位点及保护碱基遥

1.5 重组质粒的筛选及鉴定

PCR 产物回收纯化后连接入转移质粒 pMD18-T 载体遥重组 T 载体 pMD18-T-SjAK 经 EcoR 玉/Xho 玉双酶切后切下 SjAK 基因袁酶切产物纯化后导入原核表达质粒 pET32a(+)袁构建重组表达质粒 pET32a(+)-SjAK渊图 1 冤袁Xho 玉/EcoR 玉双酶切及测序鉴定无误后袁将该质粒转化入大肠杆菌 BL21遥

2 结果与讨论

2.1 测序及同源性搜索结果

将含 SjAK cDNA 的原始克隆 pTriplEx2-SjAK 进行测序袁测序的结果经 BLASTn 程序进行同源性搜索袁发现与曼氏血吸虫 SmAK cDNA 高度同源渊图 2 冤遥

从图中的比较结果来看袁我们所发现的新基因与曼氏血吸虫的腺苷酸激酶的 cDNA 序列同一性达 86% 袁是高度同源的基因遥AK 广泛存在于有机体中袁它催化 MgATP+AMP 尧MgADP+ADP 反应袁并通过这个反应来维持腺苷酸组成成分的体内平衡遥人类红细胞中 AK 酶的遗传缺陷会导致非球形红细胞溶血性贫血症 E 在大肠杆菌细胞中 AK 酶结构基因的损伤可产生条件致死性突变遥在脊椎动物中袁AK 酶至少有两种类型的同工酶 I 型 AK 酶渊K1 冤和 II 型 AK 酶渊K2 冤遥这两种类型的酶的组织分布和在细胞内的定位不同袁而彼此间在催化和免疫特性方面也不尽相同 渊图 3 冤遥

Cao 等 渊图 4 冤为了鉴定编码可溶性虫卵抗原的基因并研究这些基因的产物在肉芽肿形成过程中的作用袁用抗可溶性虫卵抗原的免疫兔血清筛选曼氏血吸虫

虫卵 cDNA 文库袁所筛到的阳性克隆中的插入序列经 GenBank 和 EMBL 数据库核苷酸及氨基酸水平的同源性搜索后袁发现一个基因所编码的蛋白与鸡的 AK 高度同源袁报道了曼氏血吸虫 AK 的 cDNA 全序列遥我们从日本血吸虫尾蚴 cDNA 文库中筛到的与曼氏血吸虫 AK 基因同一性高达 86% 的 cDNA 全编码区序列遥因而预测所发现的 cDNA 编码日本血吸虫的 AK 遥

2.2 PCR 结果

用所设计的引物以 pTriplEx2-SjAK 质粒为模板袁扩增出的片段长度与预期大小一致袁约为 627bp 渊图 3 冤遥

2.3 pMD18-T-AK 与 pET32a(+)-AK 的鉴定

两种重组质粒经 Xho 玉和 EcoR 玉双酶切后均有与预期片段大小一致的 pET32a(+)质粒片段和 SjAK 基因片段袁证明 SjAK 基因已经连接入 T 载体和表达质粒 pET32a(+)中渊图 4 冤遥

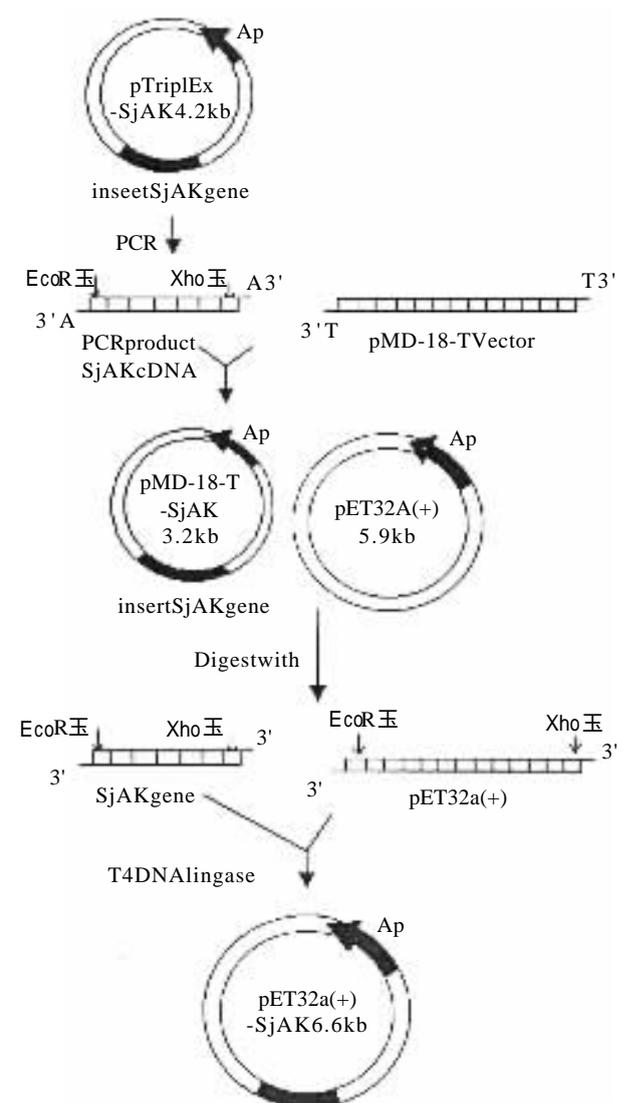


图 1 pET32a(+)-SjAK 质粒的构建图
Fig.1 Construction of the pET32a(+)-SjAK

```

Score = 654 bits (340), Expect = 0.0 Identities = 516/599 (86%),
Sm: 90  ATGactgatcagaagttagccaaagcaaaagtgatatttatttaggtggaccaggaagt 149
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sj: 99  ATGacagatcaaaagttagcaaaagcaaaagtgattttttaggtggaccaggaagt 158

Sm: 150  ggtaagggaaacacagtgtgaaaaattagtagcaaaaatttcattttaaccacttatccagt 209
      || || || || || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || ||
Sj: 159  ggaaaaggtactcaatgtgaaaaattagtagcaaaaatttaatttcaaccacttgtcgagt 218

Sm: 210  ggtgatcttttacgagctgaagttcagctctggttcacccaaaaggtaaaagattaaaagct 269
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || |||||
Sj: 219  ggtgatctgttacgtgctgaagttcagctctggttcacagaaaaggtaaaagaattgaaagct 278

Sm: 270  atgatggagagaggcgaacttgttcctttggaagttgttttagctttacttaaaagaggca 329
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || |||||
Sj: 279  atgatggagagaggagaacttgtccctttggaagttgtttgtcattactgaaagaagct 338

Sm: 330  atga-taaactggttgacaaaaattgtcatttccttatcgattagatataccacgtgaatt 388
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || || || || ||||| ||
Sj: 339  atgattaaacttgttgacaagaattgccattttcttattga-tggttaccacgtgaact 397

Sm: 389  ggatcaaggcattaagtttgaaaaagaggtatgtccttctgtgctgaattaatttcga 448
      ||||| ||||| || || ||||| ||||| ||||| || || || ||||| |||||
Sj: 398  ggatcaaggccttaaatcgaaaaagaggtttgtccctgtctatgtgtgattaatttcga 457

Sm: 449  cgtgagtgaagaagtgatgctgtaaaagactattgaaaagagcagagactagtaaatcgtgt 508
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || || ||||| || ||
Sj: 458  tgtgagtgaagaggtgatgctgtaaacgcctttgaaaagagcagaaacaagcaatcgct 517

Sm: 509  tgatgataatgaagagacaattgtgaaacgttttcgcactttcaatgaattaacaaaacc 568
      ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sj: 518  tgatgataatgaggaaaacaattgttaaacgttttcgtactttcaatgaattaacaaaacc 577

Sm: 569  tgttattgaacattataagcaacaaaataaagtaatcactattgatgcttctggtacggt 628
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| || || ||||| || ||||| || ||
Sj: 578  tgttattgaatattataagaacaaaataaagtgattactattgacgcactctggtacagt 637

Sm: 629  agacgcaattttcgacaaagttaatcatgaactcaaaaattcggtgtgaaaTAAttca 687
      || || || || || || || || || || || ||||| ||||| ||||| || |||||
Sj: 638  ggatgacatatttgaaaaactaacacatgaactgcaaaaatttggtattaaaTAAtca 696

```

图 2 日本血吸虫与曼氏血吸虫腺苷酸激酶 cDNA 同源性比较

Fig.2 Homologous comparison between Schistosoma japonicum and Schistosoma mansoni adenylate kinase cDNA

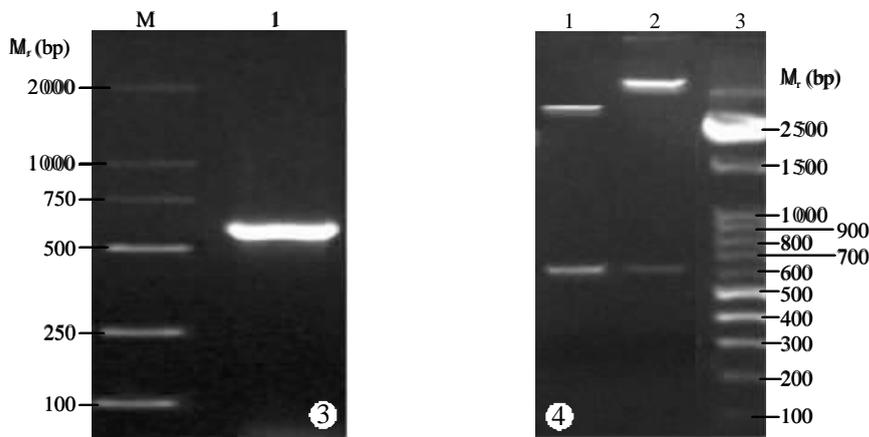


图 3 日本血吸虫腺苷酸激酶基因的 PCR 扩增结果

Fig.3 PCR amplification of adenylate kinase gene of Schistosoma japonicum

M:DNAMarker;1:PCRproduct(fragmentofAKgene)

图 4 日本血吸虫腺苷酸激酶基因重组质粒鉴定图

Fig.4 Identification of the recombinant plasmid containing adenylate kinase gene

Lane1: RecombinantpMD18-T-AKdigestedwith EcoR和 XhoI Lane2: RecombinantpET32a(+)-AKdigestedwith EcoR和 XhoI Lane3:DNAMarker

在 pET 表达系统中目标基因克隆入质粒后置于 T7 强转录翻译信号的调控之下宿主细胞中的 T7 RNA 聚合酶具有诱导表达的作用该酶具有高选择性及活跃性的特点细胞在充分诱导的条件下细胞内所有的资源将被调动起来转向目标基因的表达该系统的另一个突出特点是在未诱导时使目标基因保持转录沉默状态 pET32 系列可以使外源蛋白与 10⁹ 个氨基酸残基的硫氧还蛋白融合在一起而增加外源基因的可溶性同时还提供有在外源基因上下游与 6-His 融合表达的克隆位点诱导表达后的目标蛋白便于纯化为了进一步研究 SjAK 蛋白的功能我们拟将其在原核系统中表达

参考文献

咱暂 殷大奎 钱珂,王环增,等.中国血吸虫病流行状况要要1995 年全国抽样调查咱暂 南京大学出版社,1998.18.
咱暂 <http://www.who.int/tdr/publications/tdrnews/news60/vaccine.htm> 2000-09-08.
咱暂 WilliamsK.Parasitegenomeprojects咱暂 In: MeyersRA. Encyclopediaofmolecularbiology andmolecularmedicine咱暂 New York:VCHPublishersInc,1996.306-12.

咱暂 JohnstonDA, BlaxterML, DegraveWM, et al. Genomicsandthe biologyofparasites咱暂 Bioassays,1999,21(2):131-47.
咱暂 UnnaschT. Thefilarialgenomeproject咱暂 Parasitol Today, 1994, 10(3):415-6.
咱暂 AdamsM,DubrickM.KeriavageA., et al. ComplementarycDNA sequencing:expressedsequencetagsandhumangenomeproject咱暂 Science,1991,252(5013):1651-6.
咱暂 ChenXG,FungMC,ZhouXH,et al.ConstructionandCharacterizationoftheCDNALibraryfrom Schistosoma japonicum cercariae.An International symposiuminWuhan咱暂 B/OL 暂000-08-16. (<http://schisto/prcschisto/abst/abst7.html>)
咱暂 彭鸿娟,陈晓光,王王章.日本血吸虫中国大陸株克隆表达序列标签的获取及分析咱暂第一军医大学学报,2001,21(11):809-11.
咱暂 PengHJ,ChenXG,WangXZ.AquiringandanalysisoftheESTof Schistosoma japonicum cercariaeofmainlandstrain咱暂 J FirstMil MedUniv,2001,21(11):809-11.
咱暂 静恩焯,周波,罗杰,等.腺苷酸激酶基因在大肠杆菌中的可溶性高表达咱暂生物化学与生物物理进展,1997,24(6):525-8.
咱暂 JingEX,ZhouB,LuoJ,etal.The solubleandhighleverexpression oftheadenylatekinasegenein E.coli咱暂 BiochemBiophysDev, 1997,24(6):525-8.
咱暂 CaoM,AkridgeR.WestonD, et al. Schistosoma mansoni:cloning andsequencingofageneforadenylatekinase咱暂 ExpParasitol, 1992,74(3):357-9.

渊接 689 页冤

细胞质中的微丝微管明显减少线粒体致密及空泡化直至细胞水肿或致密样改变出现坏死和凋亡前期的变化由于星形胶质细胞可以分裂再生损伤轻微的细胞修复时可能产生大量胶质纤维酸性蛋白并分泌一些与应激有关的细胞因子使星形细胞产生广泛的应激反应

还有研究显示应力使星形细胞体积产生轻度改变就可导致其功能发生显著变化 Di 等的研究表明使硅胶膜产生 6.5mm 轻度牵张导致星形细胞体积发生轻度变化即可使星形细胞膜阳离子通道改变牵张所致的星形细胞阳离子电流的变化可能与损伤所致的星形细胞肿胀有关牵张变形还可以导致星形细胞内皮素 -1 产生和分泌明显增加因此星形细胞在颅脑创伤中应力所致的星形细胞牵张变形可使其功能发生明显变化而引起神经元功能改变这在脑损伤的病理过程中可能具有重要意义

参考文献

咱暂 MccarthyKD, VellisJD. Preparationofseparateastroglialand oligodendroglialcellculturesfromratcerebraltissue咱暂 J Cell Biol,1980,85(3),890-902.

咱暂 王克万,尹志勇,杨志焕,等.培养大鼠皮层神经元损伤后 c-fos 蛋白表达咱暂中华创伤杂志,1998,14(4):219-22.
咱暂 WangKW,YangZH,WangZG, et al. ExpressionofC-fosprotein afterculturedcorticalneuroninjuryinrats咱暂 ChinJTraumatol, 1998,14(4):219-22.
咱暂 王克万,杨志焕,王正国,等.培养大鼠皮层星形细胞牵张损伤模型咱暂中华创伤杂志,1999,15(2):113-6.
咱暂 WangKW, YinZY,YangZH, et al. A modifiedmodelofstretch-inducedinjuryonculturedcorticalastrocytesinrats咱暂 ChinJ Traumatol,1999,15(2):113-6.
咱暂 OkimuraY,TannoH,FukudaK, et al. Reactiveastrocytesinacute stage after experimental braininjury: relationship to extravasated plasma protein and expression of heat shock protein咱暂 J Neurotrauma,1996,13(7):385-93.
咱暂 AhmedSM,RzigalinskiBA,WilloughbyKA, et al.Stretch-induced injuryaltersmitochondrialmembranepotentialandcellularATPin culturedastrocytes andneurons咱暂 J Neurochem, 2000, 74(5): 1951-60.
咱暂 DiX,GoforthPB,BullockR, et al. Mechanicalinjuryaltersvolume activatedionchannelsincorticalastrocytes咱暂 ActaNeurochir, 2000,76(Suppl):379-83.
咱暂 OstrowLW, LanganTJ, SachsF. Stretch-inducedendothelin-1 productionbyastrocytes咱暂 J Cardiovasc Pharmacol,2000,36(5 Suppl1):s274-7.

紫外线照射前后日本血吸虫尾蚴抗原的初步分析

李 华 袁晓光 袁培梁 袁晓红 袁树满 袁鸿娟 袁 昆 第一军医大学寄生虫学教研室 广东 广州 510515 袁

摘要目的 探讨日本血吸虫尾蚴经紫外线UV照射后抗原成分的改变方法 日本血吸虫尾蚴经UV 400 滋/cm²照射 1min 后取其可溶性抗原经照射尾蚴抗原(UVCA)与未经照射的尾蚴可溶性抗原(NCA)同步进行SDS-PAGE 和免疫印迹试验结果 经UV照射后日本血吸虫尾蚴新出现了 M_r212000 和 82000 抗原带袁 116000 尧6000 和 16000 抗原带浓度明显升高NCA 的 M_r67000 分子仅能被 UVCA 免疫猪血清识别 而不能被感染猪血清识别袁 79000 和 94000 与免疫猪血清的反应也明显强于感染猪血清遥结论 UV照射后新出现或含量增加的抗原成分以及仅免疫猪血清所识别的抗原分子可能是照射尾蚴激发高度保护性免疫的主要因素遥

关键词紫外线 日本血吸虫 尾蚴 抗原

中图分类号 院532.21 文献标识码 院 文章编号 院000-2588(2002)08-0697-03

Preliminary study of cercaria antigen of *Schistosoma japonicum* before and after ultraviolet irradiation

LIHua, CHENXiao-guang, YANGPei-liang, ZHOUXiao-hong, SHENShu-man, PENGHong-juan, WUKun
Department of Parasitology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the changes in the constituents of the cercaria antigen of *Schistosoma japonicum* before and after ultraviolet irradiation. **Methods** The cercariae of *Schistosoma japonicum* were exposed to ultraviolet light (UV) irradiation at a dose of 400 滋/cm² for 1 min, and the UV-irradiated cercaria antigen (UVCA) and normal cercaria antigen (NCA) were simultaneously analyzed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting. **Results** At least 2 antigens with relative molecular mass (M_r) of 212 000 and 82 000 were identified in UVCA but not in NCA by SDS-PAGE analysis, and the concentrations of the antigens with M_r of 116 000, 26 000 and 16 000 in UVCA were significantly higher than those in NCA. On the other hand, the antigenic molecule with M_r of 67 000 in NCA was recognized by serum from pigs vaccinated with UV-attenuated cercariae, but not by serum from pigs with *Schistosoma japonicum* infection. Antigens with M_r of 79 000 and 94 000 were apparently more strongly reactive with the former porcine serum than with the latter. **Conclusion** The results suggest that all the novel antigens arising from or increased by UV exposure, or antigens specifically recognized by serum from pigs vaccinated by UV-attenuated cercariae may be the principal factors in the highly protective immunity provoked by irradiated cercariae.

Key words: ultraviolet irradiation; schistosoma japonicum; cercaria; antigen

WHO/TDR 曾以小鼠为模型对 6 种血吸虫疫苗候选分子进行评价袁结果小鼠体内产生的保护性免疫力均未达到降低虫荷 40% 或更多的预期目标袁而经酌射线或紫外线照射减毒尾蚴能激起机体较强的保护性免疫袁减虫率可高达 90%袁而且袁这种保护性免疫力可通过血清被动转移给其他动物袁因此袁人为照射致弱尾蚴是目前最有效的免疫原遥为了从照射尾蚴抗原中寻找激发机体保护性免疫的抗原成分袁本研究就紫外线照射前后日本血吸虫尾蚴可溶性抗原成分进行了对比分析遥

1 材料与方

1.1 器材及试剂

收稿日期 院002-01-22

基金项目 院联合国开发计划署 / 世界银行 / 世界卫生组织 / 热带病研究与培训特别规划署资助项目 院00191 袁

作者简介 院李 华 院968- 袁男 袁湖南平江人 袁997 年毕业于湖南医科大学 袁硕士袁讲师 袁电话 院20-61640114-89121

ZG-4 渊尧尧型紫外线辐射计为中国建材院石英所产品袁54nm 的紫外线照射箱由本校防原医学教研室提供袁感染日本血吸虫的阳性钉螺购自湖南省寄生虫病研究所 渊岳阳袁IRP 标记羊抗猪 IgG 购自晶美生物工程有限公司 渊录号 6050-05 袁

1.2 紫外线照射尾蚴抗原 渊ltraviolot-inadiatecerara antigen, UVCA 渊的制备

取阳性钉螺袁于纯净水中 28 益光照解箱逸出尾蚴袁用玻璃吸管吸取水表尾蚴 1ml 袁放入直径 2 cm 的小平皿袁用 254nm 的紫外线照射 渊00 滋/cm² 60 s 后袁转入 4 益的生理盐水中袁000r/min 离心 10min 袁弃上清袁-20 益备用遥

1.3 正常尾蚴抗原 渊ormalcercara antigen, NCA 渊的收集

同上吸取尾蚴袁不经照射袁直接转入 4 益的生理盐水中袁同上离心处理袁-20 益备用遥

1.4 正常猪血清的收集

取从非血吸虫病疫区购买的 15kg 生猪袁耳静脉采血袁分离血清袁-20 益备用遥

1.5 感染猪血清的制备

用接种环捞取新逸出的尾蚴于 24 mm伊4 mm 的盖玻片上袁显微镜下计数渊共 6000 条冤后袁经腹部皮肤感染 15kg 生猪袁一周从耳静脉采血袁分离血清袁 -20 益备用遥

1.6 免疫猪血清的制备

用接种环捞取新逸出的尾蚴于 24 mm伊4 mm 的盖玻片上袁显微镜下计数渊共 12000 条冤同 1.2 用 UV 照射 1min 后袁经腹部皮肤接种袁一周从耳静脉采血袁分离血清袁 20 益备用遥

1.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳

分别用 8% 和 12% 的分离胶袁% 的浓缩胶袁将 NCA 和 UVCA 同时电泳袁先用稳压 80 V袁到达分离胶时换成 120 V袁当溴酚蓝指示线距胶的底端 0.5cm 时袁终止电泳袁进行银染色袁用凝胶分析系统分析电泳结果遥

1.8 免疫印迹试验 渊zyme-linked immunoblotting, ELIB冤

同上电泳后袁参照 Bio-Rad 产品使用说明书袁将半干转印槽将抗原带转移到 pvdf 膜上渊转印条件 6 V袁 6min冤袁用封闭液 渊% 脱脂奶粉, 0.01mmol/L pH7.4PBS冤 7 益封闭 1 h袁用血清稀释液渊% 新生牛血清袁 0.05% Tween-20, 0.01mmol/L pH7.4PBS冤 分别将免疫猪血清尧感染猪血清和正常猪血清作 1:50 稀

释袁 7 益孵育 2 h袁用洗涤液渊 15% Tween-20, 0.01 mmol/L pH7.4PBS冤 洗涤 5 min袁袁次袁用酶标羊抗猪二抗袁 7 益孵育 1 h袁袁上洗涤袁底物显色遥

2 结果

2.1 电泳结果

将同批收集的 NCA 和 UVCA 经 SDS-PAGE 袁染色袁结果 UVCA 在 M_r 212000 和 82000 处出现蛋白主带袁而 NCA 未见这 2 条蛋白带 渊VCA 的 116 000 尧 26000 和 16000 蛋白带浓度明显高于 NCA 曰另一方面袁 VCA 出现的 150 000 和 97 000 蛋白区带在 UVCA 不明显 渊图 1冤袁 VCA 和 NCA 的其他相对分子质量的蛋白主带大致相同 渊表 1冤遥

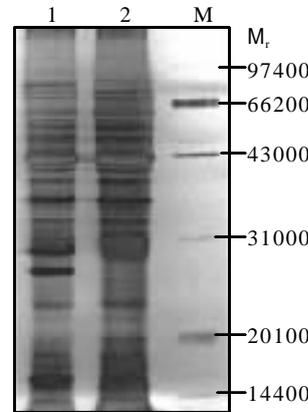


图 1 紫外线照射前后日本血吸虫尾蚴抗原的 SDS-PAGE 分析 Fig.1 SDS-PAGE analysis of the cercaria antigen of Schistosoma japonicum before and after ultraviolet irradiation Lane1:Ultraviolet-irradiated cercaria antigen(UVCA);Lane2: Normal cercaria antigen(NCA);M: Molecular weight protein marker

表 1 UVCA 与 NCA 的 SDS-PAGE 比较分析 Tab.1 SDS-PAGE analysis of UVCA and NCA

Antigen	Strongbands(伊0)	Weakbands(伊0)
UVCA	170,94,82,62,54,49,43,42,38,35,32,28,26,23,22,20,18,3,17,16,14,2	126,110,76,70,57,40,24,13,3
NCA	170,84,76,70,62,54,49,42,40,38,35,32,28,23,22,20,18,15,3,14,2,	119,110,57,46,34,33,26,24,16,13,3

2.2 免疫猪血清与 UVCA 和 NCA 的 ELIB 结果

UVCA 和 NCA 经 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳后袁转移到 PVDF 膜上袁用免疫猪血清与之反应袁结果 UV 照射尾蚴免疫的猪血清与 UVCA 在 M_r 26000 处出现一条明显的反应带袁而与 NCA 未出现明显的反应带 渊图 2冤袁免疫猪血清与 UVCA 和 NCA 的其他反应带大致相同 渊表 2冤遥

表 2 UV 照射尾蚴免疫猪血清与 UVCA 和 NCA 的 ELIB 比较分析

Tab.2 Comparison of bands of UVCA and NCA reacted with VPS by ELIB

Antigen	Strongbands(伊0)	Weakbands(伊0)
UVCA	94,85,80,70,62,60,45,42,26	114,58,54,48,46
NCA	94,85,80,70,62,60,45,42	114,58,54,48,46

ELIB: Enzyme-linked immunoblotting

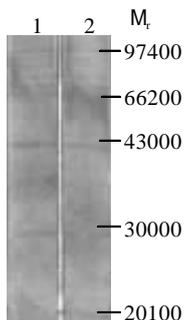


图 2 紫外线致弱尾蚴免疫猪血清与紫外线照射前后尾蚴抗原的免疫印迹分析 Fig.2 Western blotting analysis of UVCA and NCA reacted with serum of pigs vaccinated with UV-attenuated cercaria (VPS) Lane1:UVCA;Lane2:NCA

2.3 NCA 与免疫猪血清和感染猪血清的 ELIB 结果

NCA 经 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳后袁转移到 PVDF 膜上袁分别用免疫猪血清和感染猪血清与之反应袁结果 NCA 的 M_r 为 67000 处与免疫猪血清出现明显的反应带袁与感染猪血清未出现反应带袁 4000 和 79000 与免疫猪血清的反应带也明显强于感染血清 曰与之相反袁在 169000 尧 43000 和 56000 处袁 VCA 与感染猪

血清反应带较与免疫猪血清的反应带明显。图 3 显示免疫猪血清和感染猪血清与 NCA 的其他反应带大致相同。

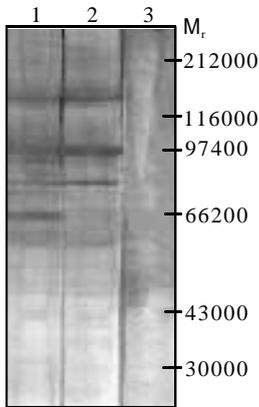


图 3 正常尾蚴抗原与不同猪血清的免疫印迹分析
 Fig.3 Western blotting analysis of normal cercara antigen reacted with different porcine sera
 1:NCAreactedwithVPS;2:NCAreacted withIPS;3:NCAreactedwithNPS

表 3 免疫猪血清和感染猪血清与 NCA 的 ELIB 分析
 Tab.3 Comparison of bands of normal cercara antigen reacted with VPS and IPS by ELIB

Serum	Strongbands(伊 ⁰)	Weakbands(伊 ⁰)
VPS	153,102-95,94,82,79,67	223,194,177,143,121,109,60,56,48,46,32/31,28/26
IPS	169,153,143,102-9582,56	223,194,177,121,109,94,79,60,48,46,32/31,28/26

VPS:Serumofpigs vaccinatedwithUV-attenuatedcercara;IPS:Serumof pigsinfectedwithschistosomajaponicum;ELIB:Enzyme-linked immunoblotting

3 讨论

UV 照射可直接引起曼氏血吸虫尾蚴表面糖类抗原的显著改变。而这些修饰抗原有助于增强照射尾蚴的免疫性。本研究的 SDS-PAGE 结果显示 UVCA M_r 为 212000 和 82000 的主带在 NCA 未出现。UVCA 的 M_r 为 116000、6000 和 16000 的抗原带浓度也明显高于 NCA。与之相反，NCA 中出现的 M_r 为 150000 和 97000 的蛋白区带在 UVCA 中不明显。表明日本血吸虫尾蚴经 UV 照射后其抗原成分出现了较大的改变。除了新出现或一些抗原成分的含量增加外，某些抗原成分也会丢失或含量减少。这些抗原成分的改变是 UV 照射直接引起的抗原修饰，还是改变了的抗原基因表达的开关状态，尚待研究证

实。

在 ELIB 中，UV 照射尾蚴免疫猪血清与 M_r 为 26000 的 UVCA 分子出现明显的反应带，而与 M_r 为 26000 的 NCA 分子未出现明显反应带。提示 UV 照射增强了血吸虫尾蚴的 M_r 为 26000 的抗原的免疫性。 M_r 为 67000 的 NCA 与免疫猪血清出现明显的反应带，与感染猪血清未出现反应带。 M_r 为 94000 和 79000 的 NCA 与免疫猪血清的反应带也明显强于感染血清。这些抗原成分可能激起机体的保护性体液免疫。有学者认为紫外线减毒尾蚴诱导产生的较高保护力的免疫机制可能是以细胞免疫为主。本研究中 UV 照射后新出现的或含量明显增加的抗原成分是否能激发机体的保护性细胞免疫，正在进一步研究之中。

参考文献

李焱, 余新炳. 血吸虫疫苗研究面临的问题. 国外医学寄生虫病分册, 1999, 26(30): 101-3.

Shi YE, Jiang CF, Han JJ, et al. Schistosoma japonicum: an ultraviolet-attenuated cercarial vaccine applicable in the field for water buffaloes. Exp Parasitol, 1990, 71: 100-6.

Moloney NA, Bickle QD, Webbe G. The induction of specific immunity against Schistosoma japonicum by exposure of mice to ultraviolet-attenuated cercariae. Parasitology, 1985, 90: 313-23.

Mangold BL, Dean DA. Passive transfer with serum and IgG antibodies of irradiated cercaria-induced resistance against Schistosoma mansoni in mice. J Immunol, 1986, 136: 2644-8.

Dunne DW, Jones FM, Cook L, et al. Passively transferable protection against Schistosoma Japonicum induced in the mouse by multiple vaccination with attenuated larvae: the development of immunity, antibody isotype responses and antigen recognition. Parasite Immunol, 1994, 16: 655-68.

谢闻悦, 周晓红, 刘国章, 等. 紫外线减毒血吸虫尾蚴免疫兔血清 IgG 水平动态及被动转移至小鼠诱导保护力研究. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(1): 42-5.

Ruppel A, Shi YE, Moloney NA. Schistosoma mansoni and S. Japonicum: comparison of levels of ultraviolet irradiation for vaccination of mice with cercariae. Parasitology, 1990, 101: 23-6.

Wales A, Fukumoto SI, Otieno MF, et al. Effects of irradiation on surface carbohydrates of larvae of Schistosoma mansoni. Parasitology, 1993, 106: 117-25.

Wilson RA. Interferon gamma is a key cytokine in lung phase immunity to schistosomes but what is its precise role. Braz J Med Biol Res, 1998, 31: 157.

责任编辑 陶金星

更正

2002 年 7 月第 22 卷第 7 期封二第五段第二行 PubMed 治更改为野 PubMed 治
 野 M 治第七段的第七行野 MEDLINE 更改为野 PubMed 治

Fas 基因转导大肠癌细胞株的表达

李恕军¹, 肖冰², 姜泊², 韩英¹ 渊北京军区总医院消化内科 北京 100700 白第一军医大学南方医院消化内科 广州 510515 冤

摘要 目的 建立表达外源性 Fas 基因的大肠癌细胞株 观察 Fas 基因在转导前后的表达 方法 采用分子克隆技术将 Fas 基因插入真核表达载体 pBK-CMV 的多克隆位点之间 以脂质体介导法将 Fas 基因导入受体细胞 LoVo 尧 G418 筛选克隆细胞 以 dotblotting 尧 Westernblotting 检测转导细胞 Fas 基因的表达 结果 成功建立了 Fas 基因表达株 转导株在 RNA 及其蛋白水平表达均明显高于非转导株 转导细胞增殖速度尧倍增时间尧对数生长期等均比非转导株更为缓慢 袁但无显著性差异 袁在 Fas 抗体作用下 转导株细胞生长明显受到抑制 袁有非常显著性差异 遥结论 Fas 基因在大肠癌细胞中处于低表达状态 通过真核表达载体介导 袁as 基因在 RNA 及其蛋白水平能有效表达 遥Fas 表达株在 Fas 抗体作用下可明显抑制体外培养的大肠癌细胞的生长增殖 遥

关键词 Fas 基因 尧基因转导 尧大肠癌 尧细胞凋亡

中图分类号 R735.34 文献标识码 尧 文章编号 000-2588 渊2002 冤8-0700-04

Expression of Fas genes transduced into colorectal cancer cells

LI Shu-jun¹, XIAO Bing², JIANG Bo², HAN Ying¹

¹Department of Digestive Diseases, General Hospital of Beijing Command, Beijing 100700, China; ²Department of Digestive Diseases, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To construct colorectal cancer cells expressing exogenous Fas gene and observe the expression level of its mRNA and protein before and after transduction. Methods FascDNA was inserted into the multiple cloning site of the expression vector pBK-CMV with molecular cloning technique, and the resultant recombinant plasmid was transduced into colorectal cancer LoVo cells via lipofectamine. G418 was utilized to screen the positive clones containing the recombinant plasmid, where Fas mRNA and protein expression was determined with Western blotting and dot blotting. Results pBK-CMV Fas cDNA plasmid was successfully constructed. The transduced colorectal cancer cells were screened by G418 and a resistant cell line (LoVo Fas cells) was obtained. Fas expression was detected in both transduced and non-transduced cell lines, but the expression level of both Fas mRNA and protein was much higher in the former, which showed lowered proliferation rate and lengthened doubling time and logarithm growth period than the non-transduced cells, but the difference was not significant. Treatment of the transduced cells with Fas antibody produced significant difference ($P < 0.05$), manifested by apparently inhibited cell growth. Conclusions LoVo cells normally has only very low expression level of Fas gene, while transduction with pBK-Fas cDNA can enhance the efficiency of Fas mRNA and protein expressions. Fas antibody significantly inhibits the growth and proliferation of in vitro cultured Fas-expressing LoVo cells.

Key words: Fas gene; gene transduction; colorectal cancer; apoptosis

细胞凋亡是多细胞有机体为调控机体发育 尧维护内环境稳定 尧由基因控制的细胞主动死亡过程 遥这一过程与肿瘤的发生发展密切相关 遥因此 袁提出诱导肿瘤细胞凋亡是治疗肿瘤的一个新突破 遥Fas 诱导细胞凋亡 袁由于其相对的简洁性而成为凋亡机制研究中的热点 袁但 Fas 蛋白分子仍未用于临床 袁并且对大肠癌细胞的相关研究报道甚少 遥我们将 FascDNA 导入 Fas 低表达的大肠癌细胞使其逆转为高表达 袁建立表达外源性 Fas 基因的大肠癌细胞株 观察 Fas 转导株细胞体外抑瘤效应 袁为今后大肠癌的基因治疗寻找一条可行途径 遥

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株 尧细胞 尧大肠癌细胞株 LoVo 尧H5a 菌株 尧尧 pBK-CMV 载体及原始质粒 pBluecript FascDNA 均为南方医院全军消化病研究所保存 遥

1.1.2 试剂 EcoR 尧Sal 尧Xho 尧内切酶 尧Nase A 尧4 DNA 连接酶 尧购于广州基因公司 遥Lipofectamine 购于 GIBCO-BRL 公司 遥质粒提取试剂盒 尧琼脂糖 尧蛋白酶 K 尧418 尧ITC 及硝酸纤维素膜 尧为 Sigma 产品 遥Fas 抗体 尧购于武汉博士德公司 遥

1.2 方法

1.2.1 重组载体构建与鉴定 在原始质粒 pBluecript 质粒 Xho 尧位点之间有 2500bp 的 FascDNA 袁其 5' 端上游有一个 Sal 尧位点 袁在 FascDNA 终止密码子下游约 600bp 处有一个 EcoR 尧位点 尧al 尧与 EcoR 尧位点

收稿日期 001-10-05

作者简介 李恕军 渊1964- 冤男 袁内蒙古赤峰人 尧2001 年毕业于第一军医大学 尧主治医师 尧电话 010-66721629 转 8023

之间约为 1 830bp 袁根据重组真核表达载体构建方法^[1]袁证实原始质粒含有完整 FascDNA 基础上袁利用相应的限制性内切酶消化 pBluescript-FascDNA 袁融法回收 1830bp 的 FascDNA 袁在 T4DNA 连接酶作用下与经 Sal I 和 EcoR 双酶切的 pBK-Neo-CMV 载体 DNA 连接 渊 6 益 袁 0 h 袁 转化 DH5a 感受态细胞 袁 常规培养 袁 随机挑选 Amp 抗性菌落及少量制备重组质粒 袁 用 Sal I 和 EcoR 双酶切及琼脂糖凝胶电泳袁鉴定其连接效果与正确性 遥

1.2.2 基因转导与克隆筛选 按 lipofectamine 介导法^[2]袁取 0.5g/L 纯化 pBK-FascDNA 1 渊 袁 用灭菌去离子水稀释成 10 渊 袁 与 5 渊 lipofectamine 混合 袁 静置 10min 袁 转染六孔板中处于对数生长期的 LoVo 细胞 渊 伊 0⁵ cells/ 孔 袁 24 h 后 袁 418(500mg/L) 筛选转染细胞 遥 同时 袁 设 pBK 空载体和非转导细胞作为对照 遥 克隆细胞形成后 袁 随机挑选克隆 袁 大量扩增抗性细胞 遥

1.2.3 Western blotting 检测 以三去污剂裂解细胞方法^[3]制备细胞膜蛋白 袁 取 1/2 进行 SDS-PAGE 分离蛋白条带 袁 考马斯亮蓝显色及脱色 袁 仔细分辨条带差异 遥 另一半膜蛋白加样电泳后 袁 80 V 电转移过夜 袁 SDS 变性 NC 膜 袁 常规 ABC 法结合抗体与显色 遥

1.2.4 RNA 斑点杂交方法鉴定 Fas 在转导株的表达

1.2.4.1 细胞总 RNA 的提取^[4] 分别收集 2伊0⁵ Fas 转导细胞 袁 转导空载体和非转导细胞 遥 用 PBS 洗涤 袁 分别加入异硫氰酸胍裂解液 500 渊 袁 1 mol/L NaAc 100 渊 袁 饱和酚及氯仿各 500 渊 袁 置冰浴 20min 袁 益离心 渊 2000r/min 袁 5min 遥 取水相 袁 加等体积氯仿再抽提一次 遥 用异丙醇沉淀 袁 益离心 渊 2000r/min 袁 5min 遥 用 70%乙醇洗涤一次 袁 沉淀溶于 50 渊 DEPC 水处理过的三蒸水中 袁 20 益 储存 袁 同时取少量做含量测定 遥

1.2.4.2 FasmRNA 的斑点杂交 取已定量的 RNA 样品 袁 经甲醛变性点样于硝酸纤维膜 袁 80 益 烤箱 2 h 遥 加预杂交液封口后 袁 68 益 水浴 2 h 遥 取出杂交袋 袁 杂交袋中加入探针 袁 重新封口 袁 在 68 益 中温浴 16~24 h 遥 取出杂交膜 袁 放入 2伊 SSC 和 0.1% SDS 液中 袁 室温漂洗 20min 袁 再用 2伊 SSC 和 0.1% SDS 液在 68 益 漂洗 3 次 袁 每次 10min 遥 取出 NC 膜 袁 用滤纸吸干水分 袁 保鲜膜覆盖 袁 暗室中压上 X 光胶片 袁 20 益 曝光 渊 渊

射自显影 渊 8~72h 遥 冲洗胶片 袁 晾干 袁 观察结果 遥

1.2.5 细胞生长曲线描记 在 24 孔细胞培养板中 袁 分别种入 2伊0⁴ 细胞 袁 细胞分组包括非转导细胞组 袁 Fas 转导细胞 渊 转导株组 袁 非转导细胞 + Fas 抗体组 袁 Fas 转导细胞 + Fas 抗体 渊 抗体结合组 袁 非转导细胞 + Fas 抗体浓度 1 渊 袁 100 渊 次 日 始 每天 3 孔 细胞计数 袁 连续 10 d 袁 然后根据细胞生长规律计算细胞倍增时间和描记生长曲线 遥

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS 10.0 版统计软件对相关数据进行字处理 遥

2 结果

2.1 原始质粒结构鉴定与重组真核表达载体的构建

2.1.1 原始质粒结构鉴定 原始质粒经 Xho I 内切酶消化 袁 琼脂糖凝胶电泳证实分离出 2900bp 的载体和 2500bp 的 FascDNA 全长片段 袁 如图 1 所示 遥

2.1.2 重组载体构建与鉴定 FascDNA (1830bp) 产物与载体连接后 袁 转化受体菌 DH-5a 的阳性重组子 袁 提取重组质粒 袁 经 EcoR I 和 Sal I 双酶切 袁 琼脂糖凝胶电泳可见 4500bp 的载体片段与 1830bp 的 FascDNA 片段 袁 如图 1 第 3 条泳道所示 遥

2.2 Fas 转导株的建立

2.2.1 免疫组织化学检测 LoVo 细胞株 Fas 的表达 证实 LoVo 细胞株 Fas 基因蛋白产物低表达 遥 免疫组织化学检测结果见图 2 遥

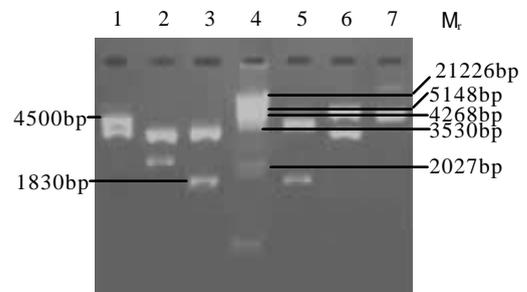


图 1 pBK-FascDNA 酶切电泳鉴定

Fig.1 Identification of pBK-Fas cDNA by electrophoresis Lane 1: pBluescriptFascDNA; Lane 2: pBluescriptFascDNA/Xho I; Lane 3: pBluescriptFascDNA/ Sal I+EcoR I; Lane 4: DNA/Hind III; Lane 5: pBK Fas cDNA/Sal I+EcoR I; Lane 6: pBKFascDNA recombinant plasmid; Lane 7: pBK-CMVcDNA blank vector/Sal I+EcoR I

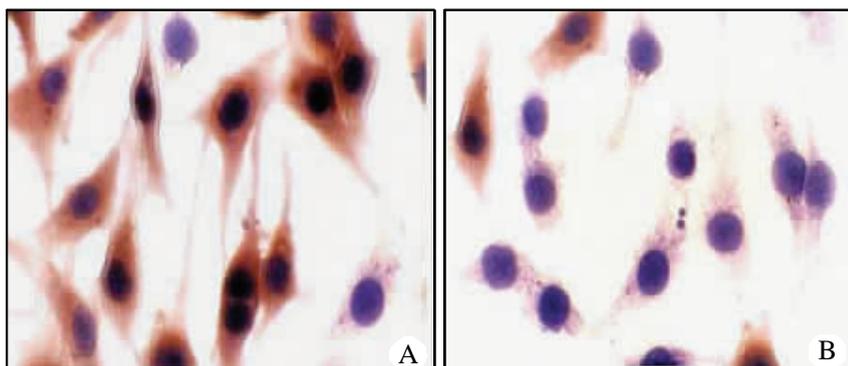


图 2 免疫组织化学检测 LoVo 细胞株 Fas 的表达 Fig.2 Fas expression in LoVo cells identified by immunohistochemistry A: Before Fas transfection; B: After Fas transfection

2.2.2 基因转导 LoVo 细胞株 基因转导后袁伊⁰ 转染细胞经 G418 筛选 4~5 周袁空载体和 Fas 表达载体转染细胞培养孔内逐渐出现抗性克隆继续抗性筛选同时袁进行扩增培养 30~40d袁结果筛出一个稳定的抗性细胞株袁 LoVoFascells 渊图 3 冤



图 3 Fas 转导细胞抗性克隆
Fig.3 Positive clones selected by G418

2.3 Fas 在转导株的表达

SDS-PAGE 显色和 Westernblotting 结果见图 4 和图 5袁在 M_r 3.6~4.0伊⁰ 处转导株比非转导株明显出现一条电泳带袁并随蛋白加样量增加而显色更加明显袁与 Fas 抗体结合的蛋白也出现印迹着色袁其大小均与 Fas 蛋白相对分子质量相符遥

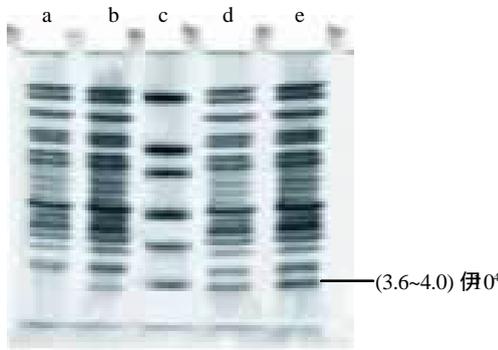


图 4 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色
Fig.4 Fas protein stained by SDS-PAGE
a:LoVocells(3伊⁰);b:LoVocells(5伊⁰);c:protein marker;d:LoVo-Fascells(1伊⁰);e:LoVo-Fascells(3伊⁰)

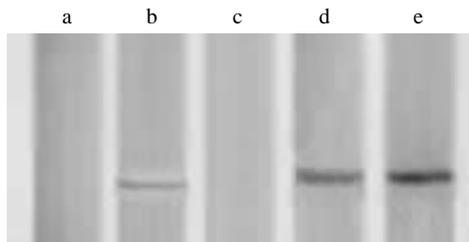


图 5 Westernblotting
Fig.5 Fas protein identified by Western blotting
Lanea:LoVocells(3伊⁰);Laneb:LoVocells(5伊⁰);Lanec: Proteinmarker;Laned:LoVo-Fascells(1伊⁰);Lanee: LoVo-Fascells(3伊⁰)

2.4 RNADotblotting 杂交分析

结果见图 6袁LoVo Fascells FasmRNA 表达信号明显高于 LoVocells 及转染空载体渊BKG渊含 CMV 启动子袁 FasDNA 渊对照组遥

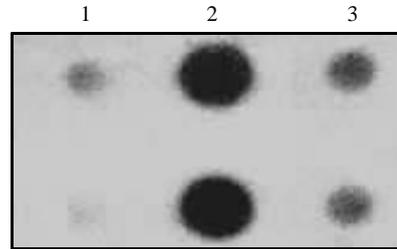


图 6 RNADotblotting 杂交分析
Fig.6 Result of Fas mRNA by dot blotting
1:LoVocells;2:LoVoFascells;3:Transducedemptyvectorcontrol cells

2.5 Fas/Fas 抗体抑瘤效应

直接记数法检测 Fas 基因转染前后及抗体结合组细胞生长曲线如图 7 所示袁LoVo 细胞群体倍增时间 2.0d袁对数生长期在 2~6d袁LoVo Fascells 细胞群体倍增时间为 4.0d袁对数生长期在 4~7d之间袁最大细胞数为 1.0伊⁰袁低于非转导株细胞袁二者比较无显著性差异袁转导 + 抗体组细胞群体倍增时间为 4.0d袁对数生长期 4~7d之间袁最大细胞数 1.5伊⁰袁明显低于非转导株细胞和单纯转染细胞袁二者比较差异有显著性意义渊<0.05冤

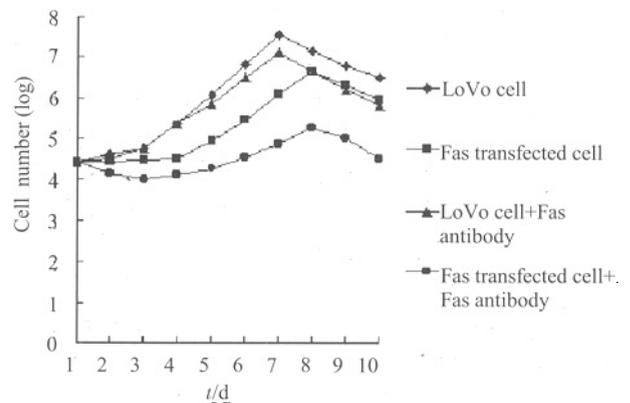


图 7 Fas 细胞生长曲线
Fig.7 Growth curves of LoVo Fas cells

3 讨论

大肠癌是一种发病率和死亡率均较高的恶性肿瘤袁近年大肠癌发病率还有不断增高的趋势袁虽然在诊治方面已经取得很大进展袁但 5 年生存率仍在 40% 左右遥因此袁如何防治袁仍然是当前工作的重点遥

近年来研究表明袁Fas 基因在肿瘤细胞的表达状态与细胞凋亡关系密切袁人类恶性肿瘤细胞系对

Fas 抗体或配体触发凋亡信号的敏感性主要依赖于细胞表面的 Fas 蛋白的表达水平。Fas 基因低表达是肿瘤细胞产生凋亡抗性的重要机制之一。因此上调 Fas 在肿瘤细胞的表达增强肿瘤细胞对凋亡的敏感性。有效启动肿瘤细胞凋亡的重要手段。大肠癌的细胞凋亡可能是通过癌细胞表面特殊受体 Fas 等作用而诱导的。根据 Fas 信号可以诱导某些肿瘤细胞凋亡的特点。利用特异性抗体或配体拮抗剂可以产生有效抗肿瘤治疗作用。^[12] 大肠癌细胞 Fas 基因多为低表达。我们对大肠癌高转移细胞株 LoVo 细胞的检测发现其 Fas 基因表达明显降低。因此为进一步证实 Fas 基因对大肠癌细胞凋亡的作用。我们将 Fas 基因转导至大肠癌细胞株。证实 Fas 基因转导诱导大肠癌细胞凋亡的作用。

在本实验中我们采用基因转染方法将克隆化的外源基因通过特定手段导入大肠癌细胞株。^[14] 利用脂质体介导的基因转染方法成功地将 Fas 表达质粒 pBKFas 转入到了 Fas 低表达的大肠癌细胞 LoVo cells, 筛选出一株稳定的 LoVoFas cells 细胞株。经过 Dot blotting 和 Western blotting 检测转导细胞株。Fas 在 mRNA 水平和蛋白水平都获得有效的表达。转导株 Fas 基因表达明显增强。结果显示低表达的 LoVo 细胞株通过 Fas 基因转导能够有效地表达较高水平的 Fas。并且 Fas 转导株在 Fas 抗体作用下肿瘤细胞生长较非转导株受到明显抑制。 $P < 0.05$ 。其机制可能与细胞凋亡有关。

参考文献

姜泊, 细胞凋亡的基础与临床[M]北京: 人民军医出版社, 1999.3-14.
 Martin SJ, Green DR. Apoptosis as a goal of cancer therapy[J] Curr Opin Oncol, 1994, 6(6): 616-21.

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy[J] Cancer, 1994, 73(8): 2013-26.
 Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA of human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis[J] Cell, 1991, 66(2): 233-43.
 姜泊, 张亚历, 周殿元, 等. 分子生物学常用实验方法[M]北京: 人民军医出版社, 1996.15-162.
 Behrmann I, Walczak H, Krhammer PH. Structure of the human APO-1 gene[J] Eur J Immunol, 1994, 24(12): 3057-62.
 Strater J, Wellisch I, Riedl S, et al. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis[J] Gastroenterology, 1997, 113(1): 160-7.
 Moller P, Koretz K, Leithauser F, et al. Expression of APO-1 (CD95), a member of the NGF/TNFR superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium[J] Int J Cancer, 1994, 57(3): 371-7.
 Meterissian SH, Kontogianna M, Po J, et al. Apoptosis induced in human colorectal carcinoma by anti-Fas antibody[J] Ann Surg Oncol, 1997, 4(2): 169-75.
 Morimoto Y, Hizuta A, Ding EX, et al. Functional expression of Fas and Fas ligand on human intestinal intraepithelial lymphocytes[J] Clin Exp Immunol, 1999, 116: 84-9.
 Arbuckle E, Langlois NE, Eremin O, et al. Evidence for Fas counter attack in vivo from a study of colorectal cancer[J] Oncol Rep, 2000, 7(1): 45-7.
 Ben-Hur H, Gurevich P, Huszar M, et al. Apoptosis and apoptosis-related proteins (Fas, Fas ligand, bcl-2, p53) in lymphoid elements of human ovarian tumors[J] Eur J Gynaecol Oncol, 2000, 21(1): 53-7.
 肖冰, 时永全, 赵燕秋, 等. Fas 基因转导胃癌细胞的表达[J] 华人消化杂志, 1998, 6(5): 400-3.
 Xiao B, Shi YQ, Zhao YQ, et al. Expression of Fas gene transduced in gastric cancer cells[J] World Chin J Dig, 1998, 6(5): 400-3.
 肖冰, 李恕军, 姜泊, 等. CD95 抑制大肠癌细胞生长的实验研究[J] 中华消化杂志, 2001, 11(11): 690-1.
 Xiao B, Li SJ, Jiang B, et al. The study of suppressing growth in colorectal cells by CD95[J] Chin J Dig, 2001, 11(11): 690-1.

焦虑有关的基因

最新研究表明如果某人具有一个重要脑基因的野等位基因,那么该携带者更易产生焦虑情绪。当然,非该基因就能决定个体是野寻烦恼型还是野无忧无虑型,对许多复杂的精神状态,有或没有该等位基因的个体间相对差异很小。该等位基因为 SLC6A4 编码的蛋白负责将神经递质 - 复合胺从一个大脑神经元传递到其它神经元。亲代将该基因短或长的拷贝传递给子代。Ahmad R. Hariri 等研究发现,拷贝编码的蛋白转运复合胺的效率较低。具有一个或两个短等位基因的个体易表现出焦虑状态。但研究人员同时指出,由于情感和个性很难客观地加以测量,因此他们利用脑成像技术测量大脑杏仁体 (amygdala) 区活动。杏仁体是大脑中与情感相关的器官。当受测者看到气愤或受惊表情时,具有一个以上短 SLC6A4 等位基因的个体杏仁体活动更为强烈。研究人员发现,虽然该差异很小,但在两个群体的志愿者中该差别是具有统计意义的。

醛固酮合成酶基因多态性与肥厚型心肌病相关性研究

陈爱华¹ 张文秀¹ 李志樑¹ 唐晓明¹ 陆青¹ 钱学贤¹ 李留洋¹ 孙家珍² 第一军医大学珠江医院心内科 广东 广州 510282 广东省心血管病研究所 广东 广州 510100

摘要 目的 观察中国华南地区汉族人群醛固酮合成酶 CYP11B2 基因 -344C/T 多态性与肥厚型心肌病 (HCM) 的相关性。方法 以 15 例 HCM 患者和 18 例正常对照为研究对象,采集血样本并提取白细胞和基因组 DNA,应用 PCR 限制性内切酶方法检测 CYP11B2 基因的多态性分布。结果 HCM 组 CYP11B2 基因 -344C/T 多态性与对照组比较,CT 基因型分布有显著性差异。结论 CYP11B2 基因 -344CT 基因型可能是部分人群 HCM 发生的因素之一。

关键词 醛固酮合成酶基因多态性;肥厚型心肌病

中图分类号 R345.47;R392.2;R542.2 文献标识码 A 文章编号 000-2588(2002)08-0704-03

Association between aldosterone synthase gene polymorphism and hypertrophic cardiomyopathy
CHEN Ai-hua¹, ZHANG Wen-xiu¹, LI Zhi-liang¹, TANG Xiao-ming¹, LU Qing¹, QIAN Xue-xian¹, LI Liu-yang¹, SUN Jia-zhen²

¹Department of Cardiology, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Institute of Cardiovascular Diseases of Guangdong Province, Guangzhou 510100, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism and hypertrophic cardiomyopathy (HCM). Methods Fifteen HCM patients and 18 healthy subjects were enrolled in this study. Peripheral blood samples were collected from these subjects to extract genome DNA. PCR and Hae III restriction endonuclease digestion were employed to study -344C/T polymorphism of CYP11B2 gene. Results CYP11B2 genes showed a significant difference in CT genotype distribution in HCM groups as compared with that in the control groups ($P < 0.05$). Conclusion CT genotype of CYP11B2 gene may be one of factors responsible for the pathogenesis of HCM in a proportion of patients.

Key words: steroid hydroxylases; gene polymorphism; cardiomyopathy, hypertrophic

肥厚型心肌病 (HCM) 是常染色体显性遗传性疾病,呈家族性或散发性发病,预后较差,猝死率为 50%。主要死于恶性心律失常。目前认为 HCM 与多种基因突变有关,其中肾素-血管紧张素-醛固酮系统参与介导心肌细胞增殖,刺激心肌胶原合成和成纤维细胞增生,导致心肌肥厚和纤维化^[1-5]。所以编码该系统的各个基因就成为研究心肌肥厚和 HCM 遗传基础的基因。本研究探讨醛固酮合成酶 CYP11B2 基因 -344C/T 多态性与 HCM 的关系,观察 CYP11B2 基因 -344C/T 多态性是否影响 HCM 肥厚基因型的表达。

1 对象和方法

1.1 研究对象

HCM 组选自我院心内科住院病人,符合 HCM 诊断标准,下述超声诊断指标,排除其他心血管内分泌及脑血管疾病,共 15 例,男 10 例,女 5 例,年龄 3.5~6.4 岁。

正常对照组随机选择我院门诊健康查体者,询问病史,体检,实验室检查,心电图及 X 线检查,排除各类心血管内分泌及脑血管等疾病,共 18 例,男 11 例,女 7 例,年龄 2.2~5.4 岁。

1.2 实验材料

PCR 反应缓冲液,脱氧核糖三磷酸 (dNTP),Taq DNA 聚合酶,IAamp DNA Kit 均为 Gene 公司产品, Hae III 限制性内切酶,UC19 DNA Marker 为 MBI 公司产品, 00bp DNA Marker 为 New England 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 测定性别,年龄,血压等指标

1.3.2 心室肥厚的检测 采用 128XP Acuson 超声心动图仪,美国 Acuson 公司,应用 M 型超声心动图,按 Sahn 等^[6]描述的标准方法测量舒张末期室间隔厚度 (IVST) 和舒张末期心室后壁厚度 (VPWT)。每个测量 3 次,取平均值。HCM 诊断标准:IVST 和 LVPWT ≥ 12 mm 且 IVST/VPWT ≥ 1.3 。

1.3.3 基因组 DNA 的提取 采用 DNA Blood Mini Kit (Gene 公司)按说明书进行操作。

1.3.4 CYP11B2 基因 -344C/T 多态性检测

1.3.4.1 引物的合成 根据 Kupari 等^[7]提供的序列,由赛百盛公司合成引物,上游序列:5'-CAGGAGGAG

收稿日期:2001-11-14

基金项目:广东省自然科学基金 90420999 年军队回国人员启动基金

作者简介:陈爱华,1956 年,男,湖南衡阳人,1983 年毕业于第四军医大学,博士,教授,主任医师,电话:20-61643016, e-mail:chenaha@21cn.com

ACCCCATGTGAC3'下游序列随 CCT CCA CCC TGTTCAGCCC3'

1.3.4.2 目的基因扩增 PCR 反应体系 30 μl 含有 10 μl Buffer 3 μl 5mmol/L 的 MgCl₂ 1.2 μl 0.1mmol/L dNTP 0.6 μl 上游引物和下游引物各 1 μl TaqDNA 聚合酶 1 U 灭菌去离子水 22.2 μl DNA 模板 1 μl 扩增条件为 94 度预变性 5min 后进入 94 度变性 60s 68 度退火 60s 72 度延伸 60s 共 35 个周期最后 72 度延伸 5min PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶及 100V 电压持续电泳 30min 紫外灯下观察电泳带

1.3.4.3 基因型检测 限制性酶切反应体系 30 μl 含有 PCR 扩增产物 10 μl XbaI 1 μl Buffer 3 μl 灭菌去离子水 16 μl 酶切条件为 37 度 2 h 产物经 2.5% 琼脂糖凝胶及 70V 电压电泳 2.5 h 紫外灯下观察电泳带进行基因型分析

1.4 统计学分析

应用 SPSS 统计软件 2000 年版对资料进行分析处理除临床参数组间比较采用 ANOVA 分析基因型及等位基因频率分布采用卡方检验

2 结果

2.1 HCM 组和对照组临床特征比较

两组间性别构成 年龄及血压均无显著性差异 P>0.05

2.2 CYP11B2 基因 -344C/T 多态性分析

CYP11B2 基因全长 537 bp 其变异是在转录调节区 -344 部位发生胸腺嘧啶 与胞嘧啶 的互换即 T344C 基因 -344T 等位基因缺乏存在于 -344C 等位基因上的 HaeIII 酶切位点所以酶切后产生 202bp 的片段即 CC 型 若不含酶切位点则产生 273bp 的片段即 TT 型 酶切后产生 202 和 273bp 片段为 CT 型 各基因型均含有多个小片段 与国外文献报道一致

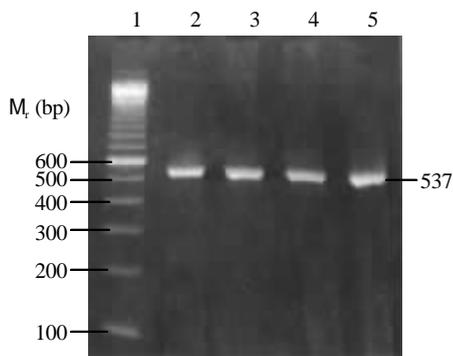


图 1 PCR 扩增 CYP11B2 基因的电泳图

Fig.1 Electrophoresis of CYP11B2 gene amplified by PCR Lane1:100bpDNA marker; Lane2-5:CYP11B2 gene(537bp)

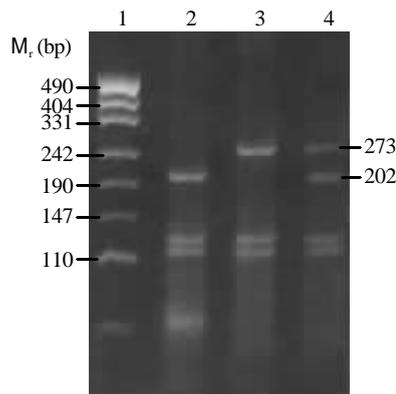


图 2 CYP11B2 基因 -344C/T 多态性的电泳图

Fig.2 Electrophoresis of CYP11B2 gene -344C/T polymorphism

Lane1:PUC19DNA marker; Lane2:CC genotype(202bp); Lane3: TT genotype(273bp); Lane4:CT genotype(273+202bp)

2.3 HCM 组和对照组 CYP11B2 基因型和等位基因频率比较

HCM 组 CYP11B2 基因 -344C/T 多态性与对照组相比 T 基因型分布有显著性差异 P<0.05

表 1 HCM 组与对照组间 CYP11B2 和等位基因频率的比较

	Control group (n=18)	HCM group (n=15)	P
Genotype frequency			
TT	10(0.56)	4(0.27)	0.095
CT	7(0.39)	11(0.73)	0.048
CC	1(0.05)	0(0.00)	
Allele frequency			
C	9(0.25)	11(0.37)	0.304
T	27(0.75)	19(0.63)	

HCM:Hypertrophic cardiomyopathy

3 讨论

CYP11B2 是醛固酮合成的关键酶 它是一种线粒体内细胞色素 p450 氧化酶 主要分布在肾上腺皮质球状带 相应的基因位于 8 号染色体上 q22 区 CYP11B2 与一个编码类固醇 11 羟化酶的相关基因相邻 11 羟化酶是皮质醇生物合成所需要的酶 CYP11B2 有两种常见的基因变异 一是转录调节区在 -344 部位 一个被公认为 steroidogenic factor-1 结合位点 发生胞嘧啶与胸腺嘧啶的互换 另一个变异为发生在第 2 个内含子的一种基因变换 血浆醛固酮水平不仅受血容量 血钾水平及肾素-血管紧张素系统活力影响 而且受 CYP11B 基因 -344C/T 多态性的影响 不同种族其多态性分布不同 日本正常人群 T 和 C 等位基因频率分别为 0.68 和 0.32 与我国正常人群一致 而高加索人正常人群 T 和 C 等位

基因频率分别为 0.53 和 0.47^响

关于肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统内各基因多态性与 HCM 的关系袁日本人研究得较多遥 Ishanov 等^响研究认为血管紧张素源 T235 可能是 HCM 肥厚心肌的预测因子曰 Yoneya 等^响和 Kawaguchi 等^响均研究发现单发型 HCM 可能由基因位点决定袁 ACE 基因的 D 等位基因可能是心肌肥厚的预测因子遥但是 Patel^响证明心肌肥厚与 CYP11B2 基因 -344C/T 尧白介素 -6 尧胰岛素样生长因子 -2 尧转换生长因子 -茁 等的多态性无相关关系袁发现肿瘤坏死因子 -琢 AA 型可能是 HCM 的修饰基因遥

通过比较 HCM 组与对照组 CYP11B2 基因 -344C/T 多态性分布袁我们发现 HCM 组中 CT 的频率渊3% 冤明显高于对照组渊9% 冤袁 CT 基因型在两组间的分布频率有显著性差异 渊<0.05 冤袁提示 CYP11B2 基因 -344CT 基因型可能是个体对心室肥厚的易感性因素之一遥本文与 Patel^响的报道不一致袁可能与入种差异或例数偏少袁也可能与当前对 HCM 的成因和环境因素尚未完全清楚有关遥至于 CYP11B2 基因 -344C/T 多态性与 HCM 相关性的机制目前还不清楚袁动物实验揭示醛固酮可通过心肌细胞上的盐皮质激素受体而直接作用于动物心脏袁刺激心肌胶原合成和成纤维细胞增生袁导致心肌肥厚和纤维化^响

本研究结果对于 HCM 发病的遗传背景提供了一些有益的新认识袁但例数偏少袁相信随着样本数增加和研究的深入渊家族调查冤可能会找到 HCM 散发或家族遗传的相关基因遥

参考文献院

响暂 BrillaCG, MatsubaraLS, WeberKT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism 响暂 Mol Cell Cardiol, 1993, 25(5): 563-75.
响暂 YoungM, FullertonMJ, DilleR, et al. Mineralocorticoids, hyperten-

sion and cardiac fibrosis 响暂 Clin Invest, 1994, 93(6): 2578-83.
响暂 DzauVJ. Local expression and pathophysiological role of rennin-angiotensin in the blood vessels and heart 响暂 Basic Res Cardiol, 1993, 88(Suppl1): 1-14.
响暂 KatwaLC, RatajaskaA, CleutjensJP, et al. ACE and kininase-II-like activities in cultured valvular interstitial cells of the heart 响暂 Cardiovasc Res, 1995, 29(1): 57-64.
响暂 BrillaCG, MaischB. Regulation of the structural remodeling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure 响暂 Eur Heart J, 1994, 15(Suppl): D45-52.
响暂 SahnD, DemaraoA, KissloJ, et al. The committee on M-mode standardization of the American Society of Echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements 响暂 Circulation, 1978, 58(6): 1072-83.
响暂 Kupari M, HautanenA, Lankinen L, et al. Associations between human aldosterone synthase gene polymorphisms and left ventricular size, mass and function 响暂 Circulation, 1998, 97(6): 569-75.
响暂 BrandE, ChatelainN, MulateroP, et al. Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension 响暂 Hypertension, 1998, 32(2): 198-204.
响暂 TamakiS, IwaiN, TsujitaY, et al. Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese 响暂 Hypertension, 1999, 33(1 Pt2): 266-70.
响0 暂 陈爱华, 张文秀, 陆青, 等. CYP11B2 和 ACE 基因多态性与高血压病的相关性研究 响暂 解放军医学杂志, 2001, 26(增刊): 129-30.
响1 暂 HautanenA, ToivanenP, ManttariM, et al. Joint effect of an aldosterone synthase gene polymorphism and classic risk factors on risk of myocardial infarction 响暂 Circulation, 1999, 100(22): 2213-8.
响2 暂 Ishanov A, Okamoto H, Yoneya K, et al. Angiotensinogen gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy 响暂 Am Heart J, 1997, 133(2): 184-9.
响3 暂 YoneyaK, OkamotoH, MachidaM, et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy 响暂 Am Heart J, 1995, 130(5): 1089-93.
响4 暂 KawaguchiH. Evaluation of cardiac function by biochemical and molecular biological techniques 响暂 Rinsho Byori, 1998, 46(4): 354-8.
响5 暂 Patel R, LimDS, ReddyD, et al. Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy 响暂 Mol Cell Cardiol, 2000, 32(12): 2369-77.

袁任编辑 黄开颜 冤

减少癌症发生的酶

苏格兰和威尔士研究人员发现缺少 MBD4 酶的小鼠更易患癌症袁该研究可能表明 MBD4 在减少人类癌症发病上也发挥同样重要的作用遥在哺乳动物中袁 MBD4 是遗传修复 DNA 的突变热点片段袁即变异最频繁而导致遗传病和癌症发生的片段遥 Catherine B. Millar 和她的研究小组发现缺少 MBD4 酶小鼠发生破坏性变异的几率是正常小鼠的 3 倍遥当该缺陷型小鼠与有患癌症倾向的小鼠交配后袁其后代患结肠癌的几率要比正常小鼠高得多遥然而缺少 MBD4 的小鼠变异修复率仍保持在 88% 袁表明 MBD4 并不是唯一的修复工

应用多重 PCR 法对广东地区 HBV 进行基因型分型

杨洁 戴琳 郭亚兵 杨守昌 王燕军 袁抗先 第一军医大学南方医院感染内科 广东广州 510515

摘要 目的 建立乙型肝炎病毒(HBV)基因型分型多重 PCR 分型方法并利用该方法对广东地区 HBV PCR 阳性血清进行分型方法 将 GenBank 中 114 例 HBV 全序列进行比较分析找出每种基因型相对于其他五种基因型的独特序列并根据这些独特序列设计出六对分别针对 A-F 基因型的特异引物 利用这六对引物建立 HBV 的多重 PCR 分型方法 结果 多重 PCR 与以前用 PCR- 限制温度长度多态型分析法的分型结果一致 对广州周边地区 HBV 携带者的初步分型结果显示主要为 B 型和 C 型 分别占 45.00% 和 38.75% 另外还有 16.25% 的 D 型 结论 用多重 PCR 分型法准确易行 灵敏度高 易于推广应用

关键词 乙型肝炎病毒 基因型 多重聚合酶链反应

中图分类号 R53;R373.2 文献标识码 文章编号 000-2588(2002)08-0707-03

Application of multiplex PCR in genotyping of hepatitis B virus prevailing in Guangdong Province of China

YANGJie, DAILin, GUOY a-bing, YANGShou-chang, WANGYan-jun, LUOKang-xian

Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To establish a convenient method for the genotyping of hepatitis B virus (HBV) using multiplex PCR. Method Based on the alignment of 114 complete nucleotide sequences of HBV DNA belonging to different genotypes, acquired from the GenBank, genotype-specific sequences were identified according to which 6 pairs of primers were redesigned corresponding to each genotype. Subsequent genotyping of HBV was performed using these primers that were readed, either alone or in conjunction with others, into a multiplex PCR reaction tube, and HBV genotype was determined according to the length of amplified DNA. Result The genotyping result of multiplex PCR was consistent with that produced by PCR-restriction fragment length polymorphism as established by Lindh. We found in this study that among the HBV carriers in the vicinities Guangzhou of City, about 45% belonged to B genotype, 38.75% to C genotype and 16.75% to D genotype. Conclusion This multiplex PCR method is simple, convenient and more differential.

Key words: hepatitis B; genotype; multiplex polymerase chain reaction

乙型肝炎病毒(HBV)可分为 A、B、C、D、E 六种病毒基因型。已有研究表明 HBV 基因型可能与 HBV 的感染途径和疾病进程相关。HBV 基因型与乙肝治疗耐药性的关系还有待进一步的研究。因此有必要建立一种简单易行快捷的分型方法,以便扩大标本的检测量,为进一步的研究建立方法学基础。目前 HBV 分型方法主要是聚合酶链反应-限制片段长度多态型分析法(PCR-RFLP)。该方法步骤较多,且遇到混合感染或酶切不完全时,容易出现复杂带型,影响分型结果的判断。

多重 PCR 指在一个 PCR 反应体系中含有多对引物的 PCR。本研究在对 114 例 HBV 全序列进行充分比较分析的基础上,找出每种基因型相对于其他各种基因型的独特序列,并根据这些独特序列设计出六

对分别针对性 A-F 型的特异引物。利用这些引物,只需一次多重 PCR 就可得出 HBV 基因型分型结果。该方法简捷、准确率高。理论上准确率应为 100%。便于大量标本的应用。利用该方法,我们对来自广州周边地区的 80 份 HBV PCR 阳性血清进行了基因分型。

1 材料与方法

1.1 血清样本

选择 HBsAg 阳性、HBeAg 阳性或阴性来自广东地区的慢性乙肝患者血清样本,并已经 Lindh 建立的前 S 基因 PCR-RFLP 方法鉴定过基因型。选 B 型、C 型和 D 型各 20 例,另外随机挑选 HBsAg 阳性或阴性 HBV PCR 阳性血清 80 例进行基因型分型。

1.2 HBV 基因组全序列

从 GenBank 中查获 114 例 HBV 全基因组序列表,其中 A 型 9 例、B 型 17 例、C 型 63 例、D 型 19 例、E 型和 F 型各 3 例。

1.3 HBV 标志物检测

用 ELISA 法检测,具体操作见中山生物工程公

收稿日期 2002-04-16

基金项目 国家自然科学基金 800125 广东省自然科学基金 80223

作者简介 杨洁, 1970- 湖北广水人, 1998 年毕业于中山大学硕士, 助理研究员。电话: 20-61641944, e-mail: yangjie@fimmu.edu.cn

司乙肝标志物操作说明书遥

1.4 血清中的 DNA 的提取

取 100 滋血清于 1.5ml 离心管中煮沸 10min袁 12000r/min 离心 10min袁取 3 滋上清于 PCR 反应管中即可遥

1.5 引物设计

用 DNASIS 分析软件对 114 例 HBV 全序列进行充分比较分析的基础上袁找出每种基因型相对于其他各种基因型的独特序列袁并根据这些独特序列设计出六对分别针对性 A-F 型的独特引物遥分别命名为院 PA尧Ar尧B尧Br尧C尧Cr尧D尧Dr尧E尧Er尧F 和 PFr遥引物的设计原则院独特引物对应于其他基因型的序列至少有 40% 的非同源性袁且引物的 3' 端至少有 2-3 个独特碱基序列遥由于 Taq 酶无 3' 端至 5' 端外切酶活性袁无校对功能袁理论上只要引物 3' 端有 1 个碱基与模板序列不配袁就不会有 DNA 的扩增遥这样袁在严格的 PCR 条件下(尽量高的复性温度)就可以避免假阳性遥引物由大连宝生生物工程公司合成遥

1.6 单纯 PCR

在六只 PCR 反应管中加入 30 滋分别含有 A-F 基因型独特引物一对和同一份标本的抽提 DNA 的反应混合物遥按照 95益袁0 s曰0 益袁0 s曰1 益袁0 s袁进行 35 个循环遥电泳观察结果袁一般只有一管为 PCR 阳性结果袁据此判断样本的基因型遥

1.7 多重 PCR(Multiplex PCR)

由于我国 HBV 多为 B尧型 和少量 D 型袁故可在同一只 PCR 反应管中分别加入 B 型尧型和 D 型三对独特引物 PB尧Br尧C尧Cr尧D尧Dr遥在严格的 PCR 条件下袁复性温度为较高的 55 益袁进行 PCR遥根据 PCR 扩增片段的大小就可以判断基因型遥B尧尧型的 PCR 扩增片段的大小分别为 590尧00 和 230 bp遥同样袁如果 B尧尧型多引物对 PCR 为阴性袁进一步做 A尧尧型多引物对 PCR袁以确定是否为 A尧尧E尧尧基因型遥

2 结果

血清样品经多重 PCR 分型结果与以前用 PCR-RFLP 法的分型结果基本一致遥对同一标本进行六个含基因型特异引物的单纯 PCR 反应后袁一般只有一个 PCR 为阳性袁从而确定其基因型遥由于我国 HBV 多为 B尧尧型和少量 D 型袁一般用 3 只 PCR 反应管分别含有 B尧尧型特异的引物对进行 PCR 反应就可以有分型结果遥简化操作后袁一只反应管用 B尧尧型引物进行多重 PCR 即可得出分型结果袁在严格的 PCR 条件下袁多重 PCR 分型结果与多个单纯 PCR 分型结果一致遥圈 1 遥说明多重 PCR 完全可

以代替多个常规 PCR 反应袁用于 HBV 分型遥个别样品在进行单引物对 PCR 时袁除一管为强阳性外渊劣势基因型冤袁还有一管为弱阳性渊劣势基因型冤遥这样的标本经多引物对 PCR 就会出现两条 DNA 带袁主带代表优势基因型袁弱带代表劣势基因型遥

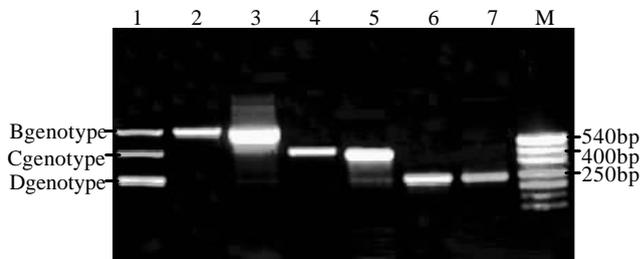


图 1 HBV 基因型的判断

Fig.1 Identification of genotype of HBV

Lane 1: Standard strips of B and D genotypes; Lane 2, 4, 6: Products of simple PCR using genotype-specific primers of B, C or D genotypes; Lane 3, 5, 7: Products of multiplex PCR amplified from the same serum of 2, 4 and 6; M: Standard DNA marker

利用该方法袁我们对来自广州周边地区的 80 份 HBV PCR 阳性血清进行了基因分型遥结果 B尧尧型分别为 36尧1尧3 例袁分别占 45.00%尧8.75%尧16.75%遥值得说明的是袁有约 10% 的标本为混合感染型袁根据优势基因型来判断遥我们试图找出 B尧尧型以外的基因型袁但目前为止袁还未成功遥

3 讨论

目前的一些研究表明 HBV 基因型与临床有一定的相关性遥Shina 等^[1]表明袁BV adr 血清型渊主要为 C 基因型冤与 adw 血清型渊主要为 B 型冤相比袁表现出更多的与肝病加重的相关性遥台湾学者^[2]的研究发现袁肝硬化患者多为 C 基因型袁占 60%遥而对照无症状携带者中 C 基因型仅占 23%遥提示 C 基因型与较为严重的肝病有关遥在西欧 90% 以上 HBV 为 A尧尧型袁类似的研究显示^[3]在慢性活动性肝炎患者中 HBV 多为 A 型渊8/35冤尧型则很少渊3/35冤遥而对急性肝炎患者 HBV 多为 D 型渊4/30冤尧型却很少渊3/30冤遥提示 A 型与乙肝慢性进程有关遥另外有数据显示 HBV 基因型与某些热点变异出现的频率有关遥如 C 基因型较多发生 nt1762-1764 位 AGG TGA 突变袁而 B 型则很少发生这种突变遥^[4]

目前所建立的 PCR-PFLP 分型方法都不能鉴定 100% 的标本袁如 Lindh 建立的针对 S 基因区段的 PCR-RFLP 分型法的 9 种酶切图谱只能鉴定 89% 的标本遥本研究所建立的 Multiplex PCR 分型方法理论上可以鉴定 100% 的标本袁因为在设计引物时就保证了每种基因型的特异性扩增遥而且袁由于酶切不完全

或其他原因。PCR-RFLP 法可能会出现较复杂的带型。为结果的判断增加了难度。非专业人员很难判断。对于同一标本混合两种基因型的 HBV 一类情况。该方法更是无能为力。而本研究的多重 PCR 分型方法就有效地克服了这些缺点。该方法简单易行。便于大量标本的应用。

HBV 基因型呈一定的区域性分布。我国主要为 B 型和 C 型。南方 B 型占优势。北方 C 型为主。以前认为我国仅在少数民族地区存在少量 D 型。而我们实验室不久前用 PCR-RFLP 分型法的研究则表明在我国宁夏和广东地区也有相当数量的 D 型。本研究的结果进一步证实 D 基因型在广州地区也占有一定比例。16.75%。值得注意的是 D 型大多存在于 HBsAg 阴性的血清中。而在 HBsAg 阳性血清中则较少。具体原因还不清楚。可见 HBV D 基因型的研究在我国特别是南方地区有重要的意义。当然。我们还需要扩大标本量。以便更为真实地体现广州地区 HBV 基因型实际分布情况。

参考文献

Okamoto H, Tsuda F, Tannaka T, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface subtype. *Gen Virol*, 1988, 69: 2575.

Norder H, Courouge AM, Magnius LO, et al. Complete genomes phylogenetic relatedness and structural proteins in six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*, 1994, 198: 489.

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 2000, 118: 554-9.

Shina S, Fujino H, Uta Y, et al. Relationship of HbsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease. Part I: analysis of 1744 HbsAg carriers. *Am J Gastroenterol*, 1991, 86: 866-71.

Lindh M, Hannoun C, Dhillon A.P, et al. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in east Asian hepatitis B virus carriers. *Infect Dis*, 1999, 179: 775-82.

Mayer C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Vir Hepatitis*, 1999, 6: 299-303.

Mzokami M, Nakano T, Orito E, et al. Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Lett*, 1999, 450(1-2): 66-71.

Lindh M. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplification. *Virol Methods*, 1998, 72: 163-74.

Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, et al. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the pre-S2-region product. *J Virol Methods*, 1999, 80: 97-112.

Norder H, Hammas B, Lee SD, et al. Genetic relatedness of hepatitis B viral strains of diverse geographical origin and natural variations in the primary structure of the surface antigen. *J Gen Virol*, 1993, 74: 1341-8.

范金水, 庄辉, 李永贵, 等. 我国八城市 HbsAg 阳性和阴性乙肝患者的病毒血清型和基因型分析. *中华微生物和免疫学杂志*, 1998, 18: 88-92.

Fan JS, Zhang H, Li YG, et al. Serotyping and genotyping of hepatitis B virus among HBsAg positive and negative hepatitis B patients in 8 cities of China. *Chin J Microbiol Immunol*, 1998, 18: 88-92.

阎丽, 侯金林, 王战会, 等. 宁夏地区乙型肝炎病毒基因型分布及 D 基因型的测序鉴定. *解放军医学杂志*, 2000, 25(1): 4-7.

Yan L, Hou JL, Wang ZH, et al. The distribution of hepatitis B virus genotypes in Ningxia area of China. *Med J Chin PLA*, 2000, 25(1): 4-7.

优势型冠状动脉闭塞致其他部位心肌梗死

Myocardial infarction in regions not corresponding to occlusion of dominant coronary artery

邱明¹, 李公信², 刘映峰² 渊广州海军疗养院门诊 袁广东广州 510320 曰第一军医大学珠江医院心血管内科 袁广东广州 510282 冤

关键词 动脉闭塞 心肌梗死 冠脉痉挛 支架植入术
中图分类号 R542.23 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2002)08-0709-02

心肌梗死是由于冠状动脉供血持久而完全中断引起心肌不可逆性的组织损害所致。遥供血部位的冠状动脉闭塞可引起相应部位的 MI。但优势型冠状动脉闭塞所致的其他

部位 MI 在临床上少见。结合临床与冠状动脉造影对照分析。报告如下。

1 临床资料

患者 1 男 袁 2 岁 袁 因发作性胸骨后疼痛 5 h 于 2001 年 3 月 5 日 2 院 0 急诊入院。入院前 5 h 在开摩托车回家途中突感

收稿日期 院 001-12-28
作者简介 邱明 渊 1969- 冤 女 袁 湖北黄冈人 袁 1992 年毕业于南京海军医学专科学校 袁 在职研究生 袁 主治医师 袁 电话 院 20-87191609

补阳还五汤对大鼠脑皮层神经元生长的影响

佟丽 鞠宏达 袁育尧 袁剑刚 第一军医大学中医系 广东广州 510515

摘要 目的 观察含补阳还五汤的药物血清对体外培养大鼠脑皮层神经元生长的影响。为补阳还五汤治疗缺血性脑损伤提供实验依据。方法 以体外培养新生SD乳鼠大脑皮层神经元为观察对象。采用四唑盐MTT比色法测定细胞生长情况。观察含药血清对常规培养及在缺氧状态下神经元生长的影响。结果 补阳还五汤对常规培养及在缺氧条件下培养的神经元有显著促进生长作用。与空白血清组比较有显著差异。P<0.05。结论 大鼠以补阳还五汤灌胃给药后。其血清中的药物成份有促进体外培养神经元细胞生长的作用。

关键词 补阳还五汤 血清药理学 神经元 缺氧再给氧损伤

中图分类号 R285:Q421 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2002)08-0711-02

Effects of Buyanghuanwu decoction (BYHWT) on proliferation of cultured rat cortical neurons

TONG Li, QU Hong-da, CHEN Yu-yao, SHEN Jian-gang

Department of Traditional Chinese Medicine, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To observe the effect of rat serum containing Buyanghuanwu decoction (BYHWT) on the proliferation of cultured rat cortical neurons, so as to understand the mechanism of BYHWT in the treatment of hypoxia brain damage. Methods The growth of cultured rat cortical neurons were observed by MTT assay to evaluate the effect of the serum containing BYHWT on the neurons cultured in both normal and hypoxia conditions. Results BYHWT significantly promoted proliferation of the neurons cultured under both normal and hypoxia conditions, in comparison with the response of the cells to drug-free serum (P<0.05). Conclusion Some of the constituents of BYHWT in rat serum can promote the proliferation of rat cortical neurons cultured in both normal and hypoxia conditions.

Key words: BYHWT; serapharmacology; cortical neurons; hypoxia-reoxygenation injury

脑缺血性损伤是一个复杂的病理生理过程。最终导致神经细胞的结构及功能的破坏。以致迟发性神经元的死亡。补阳还五汤是清代名医王清任创立的益气活血名方。主治中风及中风后遗症。近年来大量的临床及实验研究证实该方治疗缺血性脑病及后遗症疗效确切。本研究观察了含补阳还五汤大鼠血清对体外培养的大鼠神经元生长的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

10只SD大鼠。雌雄各半。体重250~280g。SD新生乳鼠。~3d龄。均由第一军医大学实验动物中心提供。

1.2 试剂

RPMI1640培养基。ibco公司。胰蛋白酶。上海生物公司。胎牛血清。杭州四季青公司。MTT。美国Sigma公司。二甲亚砜。江苏富康试剂厂。

1.3 仪器

CO₂培养箱。德国HERAEUS公司。倒置显微

镜。德国徕卡公司。960酶标仪。Biorad公司。

1.4 含药血清制备及预处理

补阳还五汤主要由黄芪、当归、赤芍、地龙、川芎、红花等中药组成。按原方剂量配伍。常规煎煮。浓缩至3g/ml生药。大鼠按临床等效量3倍灌胃给药。0g/kg。b.w.生药。次/d。连续3d。于末次给药1h后。无菌条件下。腹主动脉取血。离心分离后的大鼠血清于56℃益水浴中30min灭活。经0.45μm微孔滤膜过滤除菌。分装。20℃冰箱冻存备用。空白血清组灌胃生理水。处理过程同上。

1.5 大鼠脑皮层神经元培养

取新生1~3dSD大鼠乳鼠。取出大脑皮层。剪碎。0.06%胰蛋白酶消化10min。制成单细胞悬液。接种于96孔培养板中。每孔100μl。细胞密度为1×10⁶细胞/ml。在37℃、5%CO₂条件下培养48h。镜下可见神经细胞贴壁生长。

1.6 神经元细胞缺氧模型

大鼠神经元细胞在正常条件下培养48h后。加入不同浓度的药物血清。将培养板置于缺氧罐中。5%N₂、5%CO₂。继续培养18h后。以MTT法测定细胞活性。

1.7 实验分组及细胞活性测定

实验分空白对照组。加入终体积为2%血清。10%正常大鼠血清。阳性对照组。加入等量PBS缓冲

收稿日期 002-01-25

基金项目 国家自然科学基金 9970900 广东省中医药管理局资助课题 000006

作者简介 佟丽 1956年。女。辽宁凤城人。1982年毕业于吉林大学。研究员。电话 20-61648265

液曰补阳还五汤组袁分别加入终体积为 10% 尧% 尧% 的补阳还五汤含药血清遥分别置于正常培养箱及缺氧罐中 18h 后袁加入 MTT 100 滋袁继续培养 4 h 袁弃上清袁加入二甲基亚砷 150 滋袁终止反应袁在酶标仪于 560nm 波长下测定 D 值遥

1.8 统计学处理

采用 SPSS8.0 统计软件袁以 LSD 方法进行方差分析遥

2 实验结果

2.1 对正常培养条件下神经元生长的影响

实验结果表明袁在常规培养条件下袁空白血清组与阴性对照组比较有显著性差异渊<0.01 冤袁表明不含药物的空白血清中含有对细胞生长有促进作用的成份遥补阳还五汤药物血清组在高浓度时与空白血清组比较对神经细胞有显著的促进生长作用袁随着含药血清浓度降低袁这种作用逐渐减弱袁提示血清中的药物成份对神经元有促进生长的作用遥表 1 冤遥

表 1 补阳还五汤对正常培养条件下神经元生长的影响 (n=6, \bar{x} 依)

Tab.1 Effects of rat serum containing BYHWT on the proliferation of rat cortical neurons cultured in normal condition (n=6, Mean 依 D)

Group	Different serum consistency D ₅₀		
	10%	5%	2%
Normal serum	0.269 依 0.052*	0.236 依 0.047*	0.234 依 0.047*
BYHWT serum	0.371 依 0.111#	0.291 依 0.064	0.274 依 0.059
Control	0.127 依 0.068	0.127 依 0.068	0.127 依 0.068

*P<0.01 vs control; #P<0.05 vs normal serum

2.2 对缺氧条件下神经元生长的影响

在正常条件下渊% CO₂ 尧% 益袁神经细胞培养 48 h 后袁加入含药血清袁放入 95% N₂ 尧% CO₂ 尧% 益缺氧罐中袁在缺氧条件下袁继续培养 18 h 袁以 MTT 法检测其 D 值遥实验结果表明袁在缺氧的条件下袁补阳还五汤高尧中浓度含药血清组与空白血清对照组比较袁细胞活性显著增强曰 0% 浓度组细胞活性大于 20% 组袁但统计学比较无显著性差异渊>0.05 冤袁低浓度组作用不显著渊>0.05 冤袁表 2) 遥

3 讨论

补阳还五汤主要由黄芪尧川芎尧当归尧红花等补气活血中药组成袁近代药理学实验证明该方的疗效机制与扩张脑血管尧增加脑血流量尧改善血液流变性尧降低血液粘度尧抑制血小板聚集尧调节纤溶活性和清除氧自由基等有关遥最近有研究表明袁补阳还五汤能调节

表 2 补阳还五汤对缺氧条件下神经元生长的影响(n=6, \bar{x} 依)
Tab.2 Effects of rat serum containing BYHWT on the proliferation of rat cortical neurons cultured in hypoxia condition (n=6, Mean 依 D)

Group	Different serum consistency D ₅₀		
	10%	5%	2%
Normal serum	0.258 依 0.056*	0.265 依 0.039*	0.247 依 0.058*
BYHWT serum	0.358 依 0.099#	0.466 依 0.296#	0.272 依 0.060
Control	0.149 依 0.023	0.149 依 0.023	0.149 依 0.023

*P<0.01 vs control; #P<0.05 vs normal serum

脊髓神经生长因子和 GABA 表达袁促进脊髓细胞体外成活和突起生长袁对脑损伤大鼠星形胶质细胞有促进增殖的作用遥我们研究结果证明袁对常规条件下体外培养的神经元袁补阳还五汤有促进神经元生长的作用袁并与含药血清浓度呈正相关遥在缺氧条件下袁补阳还五汤高尧中剂量血清组均有显著的促细胞生长作用袁提示补阳还五汤血清中某些有效成份有直接促进神经元生长的作用袁这对于脑缺血所致神经细胞损伤的恢复具有重要的意义袁为其临床治疗中风后遗症提供了实验依据遥补阳还五汤促进神经元生长的作用与血清中的药物成份密切相关遥药物经口服入血后袁经过体内的物质代谢袁其中部分成份进入血液袁输送到靶器官袁发挥药物效应遥在血液中时哪种成份对神经元有促进生长的作用袁有待于深入研究遥

参考文献院

咱暂韩济生主编. 神经科学纲要咱暂北京医科大学尧中国协和医科大学联合出版社, 1993.6.
 咱暂张玲. 补阳还五汤治疗老年病近况咱暂安徽中医学院学报, 1997, 16(5):63-5.
 咱暂梦李, 王宁生. 含药血清制备方法的研究咱暂中药新药与临床药理, 1999, 5(10):290-2.
 Meng L, Wang NS. Research of the technique of making serum containing Chinese herbs咱暂New TCM Med Clin Pharmacol, 1999, 5(10): 290-2.
 咱暂Choi DM, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture咱暂Neuroscience, 1987, 7:357-9.
 咱暂Rosenbaum DM, Michaelson M, Batter DR, et al. Evidence for hypoxia induced programmed cell death of cultured neurons咱暂Ann Neurol, 1994, 36(6):864-70.
 咱暂石关桐, 石印玉, 李义凯. 补阳还五汤对周围神经损伤修复的实验研究咱暂中国中医骨伤杂志, 1997, 5渊冤-3.
 Shi GT, Shi YY, Li YK. The experimental studies of the effects of the BYHWT on regeneration and repair of injured peripheral nerve咱暂Chinese J Trad Med Traum, 1997, 5(5):1-3.
 咱暂刘鸿宇, 张海鸿, 刘汉明, 等. 补阳还五汤对脑损伤鼠星形胶质细胞增殖的影响咱暂中风与神经疾病杂志, 1997, 14渊冤-5-6.
 Liu HY, Zhang HH, Liu HM. Effect of BYHWT on the proliferation of rat glial cells after brain damage咱暂J Stroke Neural Dis, 1997, 14(2):95-6.

显微外科技术建立兔异体原位肾脏移植模型

张勇¹袁于立新¹袁贾英斌¹袁王亦斌¹袁杨培梁² 第一军医大学南方医院¹ 肾移植科袁动物实验中心袁广东 广州 510515

摘要目的 建立并发症少尧存活率高的兔原位肾脏移植模型。方法 健康成年新西兰白兔 24 只随机分为两组。每组 12 只。袁组为对照组。袁中行右肾动脉尧静脉暂时夹闭做为对照。白组为异体原位肾脏移植组。袁采取配对方式将甲兔左肾切除并经过 4 益 H-CA 液灌洗后利用显微外科技术将甲尧乙两兔动脉尧静脉及输尿管端端吻合。结果 吻合口无血栓形成及狭窄。袁 12 只接受异体原位肾移植的兔子存活率为 91.7%。渊 1/12。结论 此模型具有并发症少尧存活率高的特点。袁且稳定可靠。袁实用。

关键词肾脏移植; 兔; 显微外科技术

中图分类号 R692 文献标识码 A 文章编号 000-2588(2002)08-0713-03

Establishment of rabbit model of renal allograft transplantation using microsurgical technique

ZHANG Yong¹, YU Li-xin¹, JIA Ying-bin¹, WANG Yi-bin¹, YANG Pei-liang²

¹Department of Kidney Transplantation, ²Animal Experiment Center, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To establish rabbit model of renal allograft transplantation with reduced complications and high survival rate using microsurgical technique. Methods Twelve healthy adult rabbits were randomly divided into 2 groups of equal number, one as donor group and the other recipient. The left kidneys of the donor rabbits were removed followed by immediate reperfusion with 4益 H-CA solution, before they were transplanted into the recipient rabbits with their left kidneys excised and end-to-end anastomosis of the renal arteries, veins and ureter respectively performed with microsurgical technique. Another 12 normal rabbits received operation to temporarily block the right renal arteries and veins, serving as control group, in which 11 completed the experiment. Results No thrombosis or stricture occurred at the site of anastomosis in rabbits with renal allograft transplantation, and the survival rate reached 91.7% (11/12). Conclusion This rabbit model of renal allograft transplantation has markedly fewer complications with improved survival rate, thus providing a more practical and reliable model for experimental and clinical studies of renal transplantation.

Key words: kidney, rabbit; kidney transplantation; microsurgical technique

随着临床肾移植的广泛开展和普及,有关肾移植的动物实验及基础研究也相应地得到发展。建立稳定的实验动物模型是进行动物实验的基础。我们利用显微外科血管吻合技术,在我院动物实验中心开展了兔肾脏移植模型 12 例,成功率 91.7%。为肾移植基础研究和免疫药物筛选提供了另一稳定可靠尧方便的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

健康新西兰白兔 24 只,第一军医大学动物所。袁 3~4 月龄,袁质量 2.5~4.0 kg。袁雌雄不限。袁 H-CA 离体肾保存液。渊上海长征医院。袁

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 24 只健康成年新西兰白兔随机分为

玉尧乙两组。袁每组 12 只。袁玉组为对照组。袁中行右肾动脉尧静脉暂时夹闭做为对照。白组为同种异体肾移植组。渊 1.2.2 手术方法 所有手术采取配对方式进行。遥手术用兔于术前 24 h 禁食。袁中采用肌注氯胺酮 0 mg/kg。袁 b.w. 冤麻醉。遥给域组甲兔开腹后先暴露右肾肾蒂。袁用血管夹夹闭右肾动脉尧静脉。袁不灌洗。袁 0 min 后开放血流做为对照。遥然后游离整个左肾及输尿管上 1/3 段。袁充分显露肾蒂。袁血管夹阻断肾动脉尧静脉血流。袁-0 号丝线双层结扎。袁离断肾动脉尧静脉。袁然后结扎。袁离断输尿管。袁迅速切取左肾置入 0 益的生理盐水中。袁以 4 益 H-CA 液灌洗左肾。袁待颜色变白。尧静脉流出液基本变清后以纱布包裹置入 0 益的生理盐水中待异体移植时用。遥乙兔开腹后先切除左侧肾脏。袁在手术显微镜下以 9-0 号丝线行供尧受体动脉尧静脉血管间断端端吻合。袁吻合前将供尧受体血管喷淋罂粟碱防止血管萎缩。袁吻合即将完毕时血管内注射肝素生理盐水冲洗。遥在整个血管吻合期间。袁供肾用纱布包裹。袁不断喷淋冰生理盐水。袁防止热缺血。遥血管吻合完毕后按动脉顺序开放血流。袁重建移植肾血运。袁检查无出血后快速滴注速尿 20 mg。袁同时

收稿日期 002-04-08

基金项目 广东省卫生厅重点基金 9GDZ002 冤

作者简介 张勇, 1972 年,男,河南新乡人, 2002 年毕业于第一军医大学。袁士尧医师。袁电话 20-61641700。袁-mail:zy-candle@263.net

以温水喷淋移植肾帮助复温袁min 左右可见输尿管滴尿袁然后行输尿管端端吻合袁并将移植肾固定尧埋于乙兔左肾窝袁成乙兔左肾原位异体移植遥然后切除右侧肾脏袁成整个实验术中补液 200ml 左右袁移植肾重建血运后立即静脉注射速尿 10mg 袁并换用保肾合剂袁方乳酸钠林格氏液 250ml 尧%葡萄糖溶液 200ml 尧%碳酸氢钠溶液 50ml 尧速尿 20mg 尧胰岛素 6 U 袁术后维持输液 3 d 每天 200ml 遥术后 24 h 进食袁肌注青霉素 5 d 遥未常规或系统进行免疫抑制治疗遥

1.3 移植成功的标志

渊血管吻合完毕尧开放循环后,肾脏立刻充盈变红袁具有一定的弹性和硬度遥吻合口无漏血袁肾动脉搏动良好袁肾静脉无扭曲袁瘀血袁充盈良好袁观察 3~5min 袁可见输尿管蠕动波袁输尿管开口有尿液流出渊渊袁术后当日动物清醒后袁呼吸正常袁行走自如袁精神状态良好袁能主动饮水遥渊术后第 2 天动物精神较前日更佳袁两眼有神袁正常大小便袁腹部干燥袁主动进食饮水遥

1.4 观察指标

术前后玉尧域两组血尿素氮及血肌酐值遥

1.5 统计学处理

采用 SPSS 软件渊0.05 进行统计学处理袁全部资料行组间 t 检验遥

2 结果

12 例玉组肾动脉静脉暂时夹闭的兔子一只因失血过多死亡袁一只死于感染袁存活率 83.2% 袁其余均保持良好肾功能袁到 1 个月后按计划处死或转为其他实验用曰2 例域组同种异体肾移植兔子仅有 1 例死于输尿管瘘袁手术存活率 91.7% 袁其余分别于术后 7~15d 死于排斥反应渊病理证实冤两两组术前后血尿素氮值和两组术前后血肌酐值分别见表 1 尧遥

表 1 两组术前后血尿素氮值渊mmol/L, \bar{x} 依 s)

Tab.1 Blood urea nitrogen in rabbits of group 玉 and group 域 before and after operation (mmol/L, Mean 依 SD)

Group	n	Before operation	24h after operation	72h after operation
玉	10	7.66 依 0.85	16.62 依 0.11*	10.36 依 0.61
域	11	8.24 依 0.03	17.04 依 0.34*	10.17 依 0.59

*P < 0.001 compared with the values before operation

表 2 两组术前后血肌酐值(mmol/L, \bar{x} 依 s)

Tab.2 Blood creatinine in rabbits of groups 玉 and 域 before and after operation (mmol/L, Mean 依 SD)

Group	n	Before operation	24h after operation	72h after operation
玉	10	196.31 依 8.77	326.15 依 6.84*	225.84 依 5.46
域	11	204.10 依 4.76	337.33 依 9.25*	238.41 依 0.52

*P < 0.001 compared with the values before operation

3 讨论

目前肾移植动物模型主要包括狗肾移植模型和大鼠原位肾移植模型渊渊遥狗价格高袁而且生性凶猛袁术后难于观察检测指标曰大鼠原位肾移植模型缺点也相当明显渊一是血管纤细尧操作难度大尧技术要求高曰二是手术时间长尧易造成供肾缺血时间延长及受体肾功能损害曰三是技术仍较复杂尧并发症多或不尽合理曰四是大鼠肾脏只有蚕豆大小袁体质量只有 0.8~1.2g 袁对于需要切取肾组织渊一般 0.5g 尧并且需要保存动物的实验项目非常不合适渊家兔性格温顺袁来源广尧价格低袁易于饲养袁观察检测指标容易袁家兔肾脏重量在 13~15g 左右袁切取部分肾组织渊 5g 尧基本不影响术后的生理功能尧手术难度小尧成功率很高袁有一定显微外科基础的人员均可以完成其移植手术遥我们建立的兔异体原位肾脏移植模型成功率达到了 91.7% 袁不低于大鼠肾移植模型成功率渊0% 左右渊渊且方法简便实用袁因此为肾移植基础研究提供了稳定可靠的动物模型渊渊遥

家兔肾动脉直径 1 mm 左右袁肾静脉直径 1.5 mm 左右袁对于显微外科血管吻合并不是很困难遥但是由于家兔血管静脉壁非常薄袁且动脉静脉离断后极易收缩袁因此血管准备对于手术的成功有很大的影响遥我们的体会是术中常规多次使用肝素生理盐水冲洗管腔和吻合口防止血栓形成曰术中受体兔血管离断后仔细修剪残端处外膜袁以免将其带入吻合口形成血栓遥修剪静脉残端时尤其要非常小心袁切忌把静脉壁撕裂遥另外吻合前喷淋罂粟碱溶液渊mg+10ml 生理盐水尧以扩张血管便于吻合遥根据家兔的血管条件及显微外科血管吻合的技术要求袁我们采用了定位牵引尧严密吻合尧绝对开放后补针的策略遥具体实施方法为使用 9-0 涤纶线在 10 倍显微镜下每 90 渊断吻合一针做为牵引袁然后等距离吻合 6 针袁吻合最后一针时先打一个松结袁在血管内注射肝素生理盐水后拉紧预先打好的结袁仔细检查吻合口吻合是否严密袁有无渗漏袁以便补针袁确认无渗漏后再打紧结遥尽量杜绝开放血流后补针袁因为开放后漏血造成吻合口模糊袁视野不清袁补针不易准确定位袁容易造成吻合口不畅形成血栓袁此外开放后重新阻断血流也会人为增加供肾热缺血时间袁影响移植的成功率遥

尿瘘是手术后严重的并发症袁常引起感染导致受体死亡遥一般认为尿瘘是由于输尿管血供不足引起渊渊遥我们认为要避免尿瘘要特别注意以下四点渊渊渊渊移植肾的输尿管血供主要来自肾门的血管分支和输尿管周围组织袁因此切除供肾时要注意保留肾门较多的脂肪组织和输尿管周围较多的组织遥渊渊渊渊供肾的输尿管截取和受体的输尿管保留都要有足够的长度袁避免输

尿管吻合口出现张力... 置... 固定... 埋好移植肾... 止血管及输尿管打折遥

参考文献院

咱暂 VogtP, LipeczA, WahlingKA. Modificationoftheratkidney transplantationmodel: reductionofexperimentalanimals 咱暂 ZVersuchstierkd, 1989,32(3):111-7.
咱暂 CollierDS,Thirus,CalneR.KidneytransplantationinthedogreceivingFK-506咱暂TransplantProc, 1987,19(5Suppl6):62-4.
咱暂 樊体武,唐孝达.大鼠原位肾移植实验动物模型的建立咱暂长治医学院学报,1988,12 咱暂61-2.
咱暂 庄建平,郭震华,侯健全.大鼠原位肾移植实验动物模型的建立咱暂苏州医学院学报袁999,19(8): 856-67.
ZhuangJP,GuoZH,HouJQ.The ratmodeloftherenalallograftin

primeposition咱暂SuzhouMedcol,1999,19(8):856-67.
咱暂 黄赤兵,方玉华,吴 军,等.应用新技术建立大鼠肾移植模型咱暂中华器官移植杂志,2001,22 咱暂14.
咱暂 RitterT,SeifertM,RischK, et al.DepletionofIL-4doesnotprevent toleranceinductioninanallogeneicratkidneytransplantationmodel 咱暂TransplantProc,1999,31(12):887-8.
咱暂 KhirabadiBS,FahyGM. Cryopreservationofthemammaliankidney.I. TransplantationofrabbitkidneysperfusedwithECandRPS-2at2-4 degreesC咱暂Cryobiology, 1994,31(1):10-25.
咱暂 FrancisDM,MillarRJ,DumbleLJ, et al. Modeloforthotopicrenal transplantationintherabbit咱暂 NZJSurg,1990,60(1):45-9.
咱暂 夏穗生. Saks 液低温保存狗肾48小时移植实验报告咱暂中华器官移植杂志,1981,2:32.
咱暂 智文慧,杨冠群,刘敦贵,等.狗肾移植手术操作体会咱暂武汉医学院学报,1980,9:31.

以双上睑下垂为首发症状的中脑海绵状血管瘤 1 例

Maservephalic carernous hemaangioma with bilateral upper eyelid ptosis as the initial symptom: report of one case

潘锦权袁 亮 第一军医大学南方医院神经内科袁广东 广州 510515 冤

关键词院 眼睑下垂 海绵状血管瘤 中脑

中图分类号院 R739.41 文献标识码院 文章编号院 000-2588(2002)08-0715-01

1 病历资料

患者女袁3 岁 因双上睑下垂 4 月 再发伴视物成双 3 d 袁于 2000 年 11 月 20 日入院 缘于 2000 年 7 月 活动时出现双上睑下垂 袁按重症肌无力给予新斯的明治疗半月余 效果不佳 袁000 年 9 月 自愈 遥2000 年 11 月 17 日 出现双上睑下垂 视物成双 袁上下重影 袁眼球向上及向下活动障碍 袁有轻度头痛 袁呕吐 袁抽搐 遥查体 意识清醒 袁语言流利 袁眼睑轻度下垂 袁瞳孔不等大 袁左 2.0mm 袁右 3.0mm 袁对光反射均迟钝 袁眼球向上 尧向下活动均障碍 遥右眼球内收 尧外展稍受限 左眼球外展 尧内收活动尚可 遥双眼球轻微水平震颤 遥全身感觉系统 尧运动系统正常 遥四肢腱反射正常 袁 Babinski 征 渊袁脑膜刺激征 渊袁入院后查三大常规 尧生化 尧肝肾功能 尧肾功能 尧凝血功能均正常 遥喜龙试验阴性 遥检查头颅 BRI 和 MRA 增强示 中脑背侧 尧中脑导水管右前方占位性病变 袁病变 T1W1 袁T2W2 均低 尧高混杂信号 袁周围见 T1W1 袁T2W2 均为低信号环影包围 袁病变呈野爆米花状 遥增强见病变强化不明显 袁周围组织稍有强化 遥MRA 血管成像未见明确供血动脉 遥中脑导水管向左后方受推压移位并梗阻至三脑室 袁右侧脑室积水扩张 袁四脑室变小 遥考虑为海绵状血管瘤合并出血 尧阻塞性脑积水 袁梗阻平面在导水管 遥后转脑外科行手术治疗 遥病理切片示 右侧中脑组织扩

张血管 尧管壁较薄 袁周围脑组织灶性出血 遥病理诊断为 中脑海绵状血管瘤并出血 遥

2 讨论

颅内海绵状血管瘤是先天性血管畸形的一种 袁不是真性肿瘤 袁但又与脑动静脉畸形不同 遥它主要由缺乏肌层与弹力纤维层的不规则尧大小不等的血管腔隙组成的一堆紧挨在一起的血管组织 遥该病好发于 20~45 岁成人 袁女性多于男性 袁比例约 4.6% 1 咱暂其临床症状和体征主要根据不同病变部位而表现有院头痛 尧视力损害 尧癫痫 尧动眼及外展神经麻痹 尧颅内出血 袁也可出现颅内压增高 遥原发于中脑部位的海绵状血管报道较少 袁有人 咱暂统计颅内海绵状血管瘤约占肿瘤的 0.18% 袁且以中颅窝多见 袁而位于后颅窝中脑部位的则更少见 遥本例特点是首先出现双上睑下垂症状 袁痊愈后 4 个月再发 袁同时伴有视物成双 尧眼球活动障碍 袁症状比上次加重 遥我们推测患者第一次起病为病灶少量出血 尧损伤神经组织 少 袁症状轻 袁后经自然吸收痊愈 遥再次发病时出血量大 袁多处出血呈野爆米花状 尧并导致阻塞性脑积水 遥因此 袁对于中年女性出现双上睑下垂 尧有眼球活动受限症状的患者 袁应详细询问病史及体检并尽早行头颅 MRI 检查以鉴别脑干病变 遥

收稿日期院 001-12-05

作者简介院 潘锦权 渊974 冤 男 袁1996 年毕业于广东医学院 袁现为广东新兴天堂医院神经内科医师 袁电话院 766-2670227

参考文献院

咱暂 王忠诚. 神经外科学术学咱暂北京: 科学出版社.2000.178-94.

在气管侧后方分离颈动脉鞘剪开左侧颈动脉鞘游离颈迷走神经干,将刺激电极套在迷走神经干上刺激电极的导线通过刺激隔离器与刺激器相连接遥

1.2.3 癫痫电活动记录 在大鼠左后肢的股四头肌插入肌电记录电极记录肢体抽搐引起肌电活动遥MG记录肢体抽搐的程度用肢体肌电活动的频率遥在距前囟后 3mm 正中两侧 1~2mm 处用颅骨钻切除直径为 2~3mm 的颅骨在左右两侧钻开的颅骨里放置银制的电极记录端有球形膨大用以记录皮层脑电图遥CoG记录左侧颅骨开孔既用于加药同时用于记录 ECoG 和皮层细胞外放电遥在左侧颅骨开孔处暴露顶叶脑皮层遥用微电极拉制仪把外径为 1.4mm 的玻璃毛坏拉制成尖端开口约 1~2mm 的微电极遥电极的阻抗为 2~7MΩ遥用注射器经细针头向微电极充以经过滤的工脑脊液后把电极固定遥先用微电极操纵器的粗调把微电极尖端对准顶叶皮层上 1mm 袁打开放大器袁然后用微推进器细下降电极袁使其插入顶叶皮层 200~500μm 深处袁发现有胞外的放电后采集动作电位的原始波形及放电频率直方图遥

1.3 数据处理

为了反映迷走神经刺激对大鼠癫痫活动的抑制作用我们用如下表示迷走神经刺激前肌电活动频率 - 刺激后肌电活动频率 / 刺激前肌电活动频率伊 100%遥

2 结果

2.1 迷走神经刺激对青霉素诱发大鼠癫痫活动的抑制作用

将青霉素溶液加到大鼠一侧顶叶皮层袁经过 5~20min 左右的潜伏期后袁大鼠右侧肢体及头面部逐渐出现抽搐袁并逐渐加剧遥抽搐不累及对侧肢体遥癫痫按 Racine 法分为五级遥Ⅰ级:狗样颤动遥Ⅱ级:肌抽动遥Ⅲ级:节律性点头遥Ⅳ级:前肢阵挛遥Ⅴ级:站立伴肢体阵挛遥Ⅵ级:失去平衡遥四肢抽搐遥全身痉挛遥Ⅶ级以上的发作为人类癫痫大发作遥该研究中青霉素诱发的大鼠癫痫在Ⅶ级以上遥在大脑皮层上可记录到低波幅快波为背景袁有阵发性高波幅慢波出现遥顶叶皮层用微电极细胞外可记录到单个神经元阵发性串放电袁每串放电 3~4 个遥伴随肢体的抽搐袁大量的阵发性肌电活动遥图 1 遥而且高波幅慢波阵发性串放电的节律与肢体抽搐和肌电活动的节律相一致遥

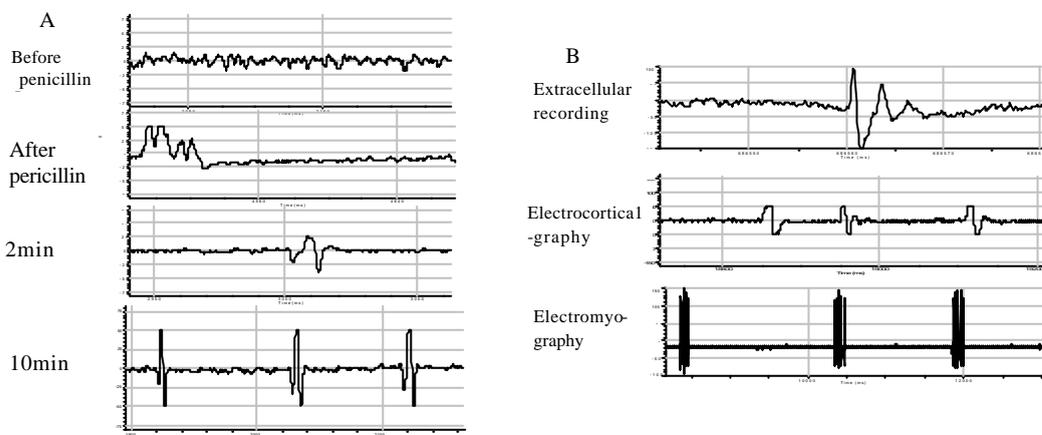


图 1 大鼠癫痫模型的皮层脑电遥肌电活动以及单个神经元细胞外放电记录

Fig.1 Electrocoorticogram, electromyogram and extracellular firing of the neurons of rat epileptic model

A:EcoGofratbeforeandafterapplicationofpenicillin;B:Afterapplicationofpenicillin,seizureappeared.Extracellularelectric activitiesoftheparietalcortexneuron(uppersection),ECoG(袁)andEMG(lowersection)wererecordedduringseizure

2.2 迷走神经刺激对青霉素诱发大鼠癫痫活动的抑制作用

当电刺激迷走神经(20Hz袁0~15s)袁经过 10~20 s 的潜伏期后袁大鼠肢体抽搐幅度遥抽搐频率逐渐减小或停止遥肌电活动的频率逐渐减小或消失遥顶叶皮层细胞外记录的阵发性串放电消失(图 2)遥

2.3 迷走神经刺激的参数对大鼠癫痫活动抑制作用的影响

迷走神经刺激的有效刺激方波宽为 0.5~1 ms袁电压为 10~15 V遥在 8 个大鼠癫痫模型上观察用不同频

率的迷走神经刺激对大鼠癫痫活动的抑制作用遥发现在 5~20Hz 的频率范围内袁随着刺激频率的增加袁迷走神经刺激对大鼠癫痫活动的抑制作用逐渐增强袁但超过 20Hz 后袁迷走神经刺激频率增加袁而对癫痫的抑制作用增强不显著遥图 3 遥

3 讨论

难治癫痫症严重危害人们身心健康和生存质量遥手术是治疗难治性癫痫的有效手段袁但手术的危险性大袁可能有神经功能缺失的副作用袁复发率较高袁非

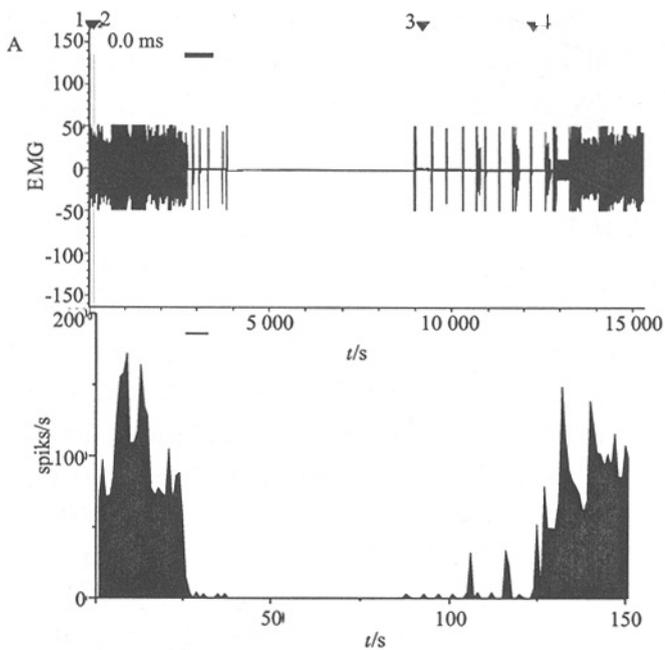


图 2 迷走神经刺激对大鼠癫痫抑制作用
Fig.2 Inhibiting effect of vagal nerve stimulation on epileptic activity in rats

A: Muscular electric activity is completely inhibited by vagal stimulation (upper diagram). The lower diagram represents the firing rate of muscular activity corresponding to the upper pane;
B: The extracellular epileptic electric activity activity is completely inhibited by vagal stimulation

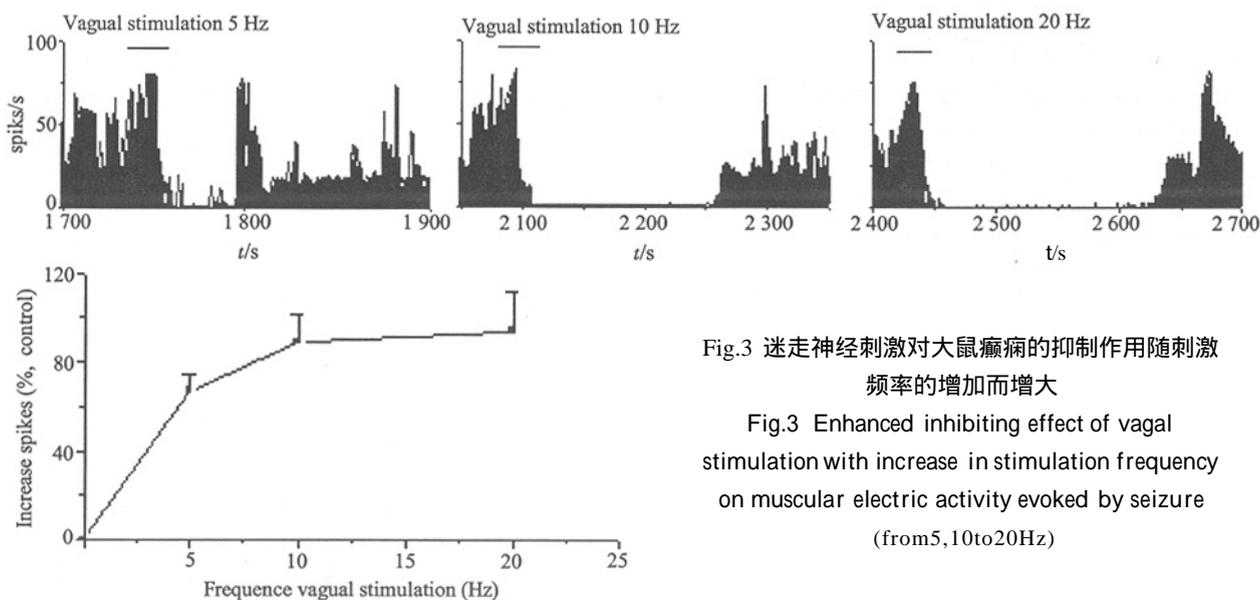


图 3 迷走神经刺激对大鼠癫痫的抑制作用随刺激频率的增加而增大

Fig.3 Enhanced inhibiting effect of vagal stimulation with increase in stimulation frequency on muscular electric activity evoked by seizure (from 5, 10 to 20 Hz)

所有难治性癫痫患者适合手术治疗和愿意手术治疗
目前迷走神经刺激治疗难治性癫痫的方法之一
在 1937 年发现电刺激迷走神经可以抑制癫痫发作
以后这种作用进一步被证实迷走神经刺激抑制癫痫的机理尚不明确
认为通过以下通路使大脑皮层等处的抑制性神经递质如 GABA 增高
其通路见图 4
1990 年美国 Cybionics 公司研制成功植入体内的迷走神经刺激器
1997 年美国、加拿大和一些欧洲国家正式批准迷走神经刺激治疗癫痫
目前在美国每年有 3000~5000 难治性癫痫患者接受这种治疗
在我国也有少数难治性癫痫患者接受这种治疗

但在临床上迷走神经刺激对难治性癫痫控制效果评价不一
迷走神经刺激对癫痫的抑制作用在很大程度上依赖于刺激的参数和刺激的时机
目前

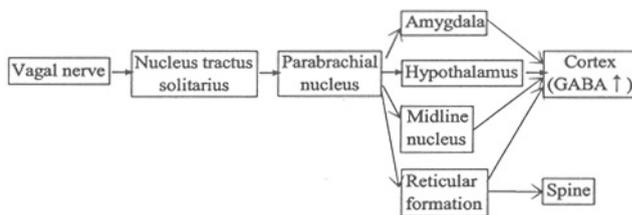


图 4 刺激迷走神经控制癫痫的机制
Fig.4 Mechanism of controlling epilepsy by vagal nerve stimulation

于对临床上迷走神经刺激频率对控制癫痫效果的研究较少
本文从动物行为、脑电和肌电、单细胞记录等不同水平观察到迷走神经刺激对癫痫活动有明确的抑制作用
0 Hz 以下的迷走神经刺激对癫痫抑制效

应用十六烷基三甲基溴化铵纯化 PCR 产物

张宝¹袁文丽¹袁莉扬²袁清华¹袁秋野¹袁文岭³渊第一军医大学生化教研室袁广东 广州 510515曰西安交通大学生化教研室袁陕西 西安 710049曰广州军区总医院分子肿瘤研究所袁广东 广州 510010冤

摘要目的 建立应用十六烷基三甲基溴化铵 hexadecyltrimethylammoniumbromide, CTAB 冤 PCR 产物纯化的方法遥方法 应用 CTAB 对 PCR 产物进行选择性的沉淀遥 CTAB 与 DNA 形成复合我 1.2mol/L NaCl 溶液中溶解袁再用乙醇将 PCR 产物沉淀出来遥结果 这种方法可以去除 PCR 产物中引物和小分子 dNTP 遥虽然纯化的产率占现在市场上的一些试剂盒产率的 80% 袁但其成本比较低袁不失是一种 PCR 产物纯化的方法遥结论 利用十六烷基三甲基溴化铵可以用于 PCR 产物纯化遥

关键词 十六烷基三甲基溴化铵; PCR 产物; 纯化

中图分类号 院 503 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588(2002)08-0719-02

Purification of PCR products with cetyltrimethylammonium bromide

ZHANG Bao¹, MA Wen-li¹, LIU Li-yang², WU Qing-hua¹, GUO Qiu-ye¹, ZHENG Wen-ling³

¹Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Biochemistry, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China; ³Institute of Molecular Oncology, General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To establish a method for purifying PCR products with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Method Selective precipitation of the PCR product was performed using CTAB, which forms compound with DNA fragment in salt solution of appropriate concentration, but not with single strand oligonucleotide or dNTPs. The precipitation could be dissolved in 1.2mol/L NaCl while the addition of ethanol caused the desired PCR product to precipitate so as to be recovered. Result The primers and small-molecule dNTP could be effectively eliminated after this procedure. Although the output of the purification process reached only 80% that by current reagent kit, it reduced the cost to as low as 1/8 of that normally required by the kit. Conclusion CTAB is applicable for purification of the PCR product.

Key words: cetyltrimethylammonium bromide; polymerase chain reaction products; purification

在分子生物学实验中袁 PCR 产物与载体连接尧测序等袁需要对 PCR 产物进行纯化遥目前许多公司都开发出试剂盒袁但其价格比较贵遥作者根据十六烷基三甲基溴化铵 hexadecyltrimethylammoniumbromide, CTAB 冤与核酸相结合的特性袁利用它进行 PCR 产物纯化袁所得的纯化产物可以用于与 T 载体连接袁提高连接效率遥

1 材料与方

1.1 材料

CTAB 为国产分析纯袁 Taq 酶尧连接酶等购自 Takara 公司袁 PCR 产物纯化试剂盒购自 Omega 公司遥

1.2 方法

1.2.1 引物合成 引物由上海博亚公司合成遥引物 A 渊'-GTAAACGACGGCCAGT-3'冤袁引物 B 渊'-CAG

GAAACAGCTATGAC-3'冤各 10 滋遥

1.2.2 PCR 扩增 挑选 2 个阳性克隆 渊转染有质粒袁 X1 尧 X2 克隆冤袁 5ml Eppendorf 管中培养 4 h 后袁取 100 滋菌液袁沸水浴 10 min 袁离心后取 5 滋上清作为模板进行 PCR 扩增袁 2 滋 mol/L 的引物 A 渊'-GTAAACGACGGCCAGT-3'冤袁引物 B 渊'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'冤各 10 滋袁 Taq 酶 5 U 袁 0 伊 buffer 10 滋袁加水补足 100 滋袁 94 益 5 min 袁 4 益 30 s 袁 80 益 30 s 袁 2 益 1 min 袁 5 次循环曰 2 益 8 min 遥

1.2.3 应用 Omega 试剂盒纯化 PCR 产物 袁取上述 PCR 产物 40 滋袁按其说明书进行遥最后用 11 滋 H₂O 溶解回收袁用紫外分光光度计 DU530 测定 D_{260/280} 和琼脂糖电泳检测遥

1.2.4 应用 CTAB 纯化 PCR 产物 取 1.2.2 中 PCR 产物 40 滋加入 5 滋 3.5mol/L NaCl 袁混匀后加入 5 滋 10% 的 CTAB 袁混匀曰室温高速离心 10 min 袁弃上清袁加入 100 滋 1.2mol/L NaCl 重悬沉淀袁加入 270 滋的无水乙醇 袁室温离心 10 min 袁弃上清袁 5% 的乙醇洗涤沉淀袁干燥后袁 1 滋 H₂O 溶解沉淀遥检测同 1.2.3 遥

收稿日期 院 002-03-29

基金项目 院 国家自然科学基金 9880032 冤

作者简介 院 张宝 渊 973- 冤 男 袁 袁宁盖县人 袁 第一军医大学在读博士 袁 电话 院 20-61641114-89098 袁 e-mail: zhangb@fimmu.edu.cn

2 结果

PCR 产物和纯化的产物电泳如图 1 所示遥小于 100bp 的 DNA 带为引物二聚体遥从图中可以看出 PCR 产物在纯化以前袁明显有引物二聚体袁在纯化之后袁引物二聚体的带消失遥表 1 列出了纯化后所得的浓度袁所得产率约为试剂盒的 80% 遥

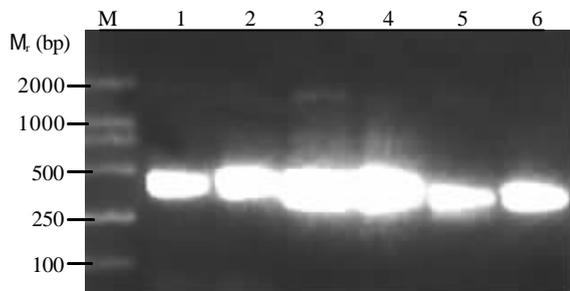


图 1 PCR 产物纯化前后电泳

Fig.1 Electrophoresis of the PCR products
M:Marker;Lanes 1,3,5 PCR products of X1 clone purified with kit of Omega, and purified with CTAB, respectively; Lanes 2,4,6: PCR products of X2 clone corresponding to lane 1,3,5 respectively

表 1 PCR 产物纯化后的浓度(滋/ml)

Tab.1 The concentration of the purified product (滋/ml)

	Purification with CTAB	Purification with kit
X1 clone	50.3	68.7
X2 clone	64.4	85.9

3 讨论

CTAB 是一种界面活性剂袁能裂解细胞并使蛋白质在溶液中成为可溶状态袁可以用于分离 RNA 和 DNA 遥 RNA 与 CTAB 结合后袁 RNA 不再是 RNase 的底物袁因此它可作为核酸的保护剂遥所分离的核酸可

以用于 RT-PCR 或 PCR 反应袁特别适合较难提取的组织袁如植物尧海藻尧细菌尧真菌等遥它能沉淀 RNA 和 DNA 袁其作用机制可能是它与多阴离子的核酸形成电中性的复合物遥这种复合物受盐浓度的影响袁当 NaCl 的浓度大于 1mol/L 时袁不能形成复合物曰当小于 0.2mol/L 时袁所有的核酸都将与 CTAB 结合曰当 NaCl 浓度在 0.3~0.4mol/L 时袁 CTAB 与单链核酸如寡核苷酸引物的结合效率很低遥从实验结果中可以看出袁采用 CTAB 的方法纯化 PCR 产物袁能够有效地除去 PCR 产物中引物二聚体袁与 Omega 试剂盒的作用具有相同的效果遥但 CTAB 纯化的方法所得的产率为 Omega 试剂盒的 80% 袁如果在加入 10% CTAB 后袁延长离心时间袁产率有所提高遥结果未列出遥与试剂盒相比袁 CTAB 法纯化 PCR 产物比较经济袁其成本是试剂盒的 1/8 左右袁而且试剂盒有一定时间限制遥 PCR 产物中含有引物和 dNTP 袁这些物质的存在将影响连接效率遥本实验室用 CTAB 纯化后所得的产物袁可以用于与 pMD-18 T 载体连接遥

参考文献院

咱暂 Macfarlane DE, Dahle CE. Isolating RNA from whole blood 要 the dawn of RNA-based diagnosis 咱暂 Nature, 1993, 362(6416): 186-8.
咱暂 Dellacorte C. Isolation of nucleic acids from thesea anemone *Condylactis gigantea* (Cnidaria: Anthozoa) 咱暂 Tissue Cell, 1994, 26(4): 613-9.
咱暂 Fiore MF, Moon DH, Tsai SM, et al. Miniprep DNA isolation from unicellular and filamentous cyanobacteria 咱暂 Microbiol Methods, 2000, 39(2): 159-69.
咱暂 Velegraki A, Kambouris M, Kostourou A, et al. Rapid extraction of fungal DNA from clinical samples for PCR amplification 咱暂 Med Mycol, 1999, 37(1): 69-73.
咱暂 Belyavsky A, Vinogradova T, Rajewsky K. PCR-based cDNA library construction: general cDNA library at the level of a few cells 咱暂 Nucleic Acids Res, 1989, 17(8): 2919-32.

自体免疫疾病相关的基因的发现

美国科学家对鼠进行的实验显示袁一种基因可能在自体免疫疾病的形成过程中起关键作用遥这一发现为从分子角度研究人类自体免疫疾病的致病机制提供了借鉴遥

人体免疫系统有时会将自身的正常组织错当成入侵的异物组织袁对其发起攻击袁从而引发自体免疫疾病遥如风湿性关节炎和多发性硬化症等遥美国弗吉尼亚大学的科学家们在研究易患自体免疫疾病的实验鼠的过程中发现袁鼠体内的一种基因与自体免疫疾病存在相关性遥

科学家们在新一期美国科学杂志上报告说袁这种基因编码的蛋白质功能是充当组胺的受体遥组胺本身作为一种信号分子袁能影响到生物体的免疫反应遥他们计划下一步继续了解该基因编码的组胺受体在自体免疫疾病中究竟起到何种作用遥科学家们指出袁鼠与人类在自体免疫疾病的致病基因上存在着一致性袁因此袁鼠为模型进行的研究袁将有助于理解人类的自体免疫疾病遥他们认为袁类似的研究也许可以促进寻找更有针对性的自体免疫疾病新疗法遥

肝素锂抗凝采血对 FT₃、FT₄ 及 TSH 测定的影响

何国荣 程蔚 黄玉英 第一军医大学珠江医院核医学科 广东 广州 510282

摘要 目的 探讨肝素锂抗凝标本能否取代或与普通干燥管标本通用方法。随机取受试者 32 例,一次肘静脉穿刺采血 6ml,分装于肝素锂真空管、肝素管、普通干燥真空管、管各 3ml,化学发光免疫分析常规测定各自的 TSH、FT₃ 及 FT₄。结果 32 例受试者 2 种试管采血测定的 TSH 及 FT₄ 值无明显差异, TSH: $t=1.846, P=0.075$; FT₄: $t=1.649, P=0.110$ 。且高度相关, TSH: $r=1.000, P=0.000$; FT₄: $r=0.999, P=0.000$ 。临床诊断完全一致。FT₃ 的结果则显著不同,肝素管测定的结果显著低于干管, $t=-6.253, P=0.000$ 。绝对值相差最大为 16.44pmol/L,最小为 0.76pmol/L,相对相差最大为 57.5%,最小为 15.6%。但 2 组 FT₃ 测定值具有高度相关性, $r=0.999, P=0.000$ 。若通过回归处理建立肝素管自己的正常值范围,它们的诊断结果完全一致。结论 肝素管与干管采血测定 TSH、FT₄ 结果完全一致,可以通用。而肝素管与干管测定的 FT₃ 显著不同,不能通用。但两组数值高度相关,可以通过建立各自的正常值或回归方程进行数据处理后互相替代。

关键词 甲状腺功能试验;化学发光免疫分析;抗凝剂;肝素锂

中图分类号 R817.4 文献标识码 A 文章编号 000-2588(2002)08-0721-03

Effect of heparin lithium as anticoagulant in assay of FT₃, FT₄ and TSH

HEGuo-rong, CHENGWei, HUANGYu-ying

Department of Nuclear Medicine, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To evaluate the application of heparin lithium as anticoagulant in in vitro tests of thyroid function. Methods The blood samples obtained by venipuncture from 32 subjects (including 10 normal subjects and 22 patients with thyroid disorder) were collected in parallel dry vacuum tubes with one of them containing heparin lithium, for assay of TSH, FT₃, FT₄ by chemoluminescence immunoassay. Results No difference was found in TSH and FT₄ levels determined separately from the parallel tubes (TSH: $t=1.846, P=0.075$; FT₄: $t=1.649, P=0.110$) with closely correlated results (TSH: $r=1.000, P=0.000$; FT₄: $r=0.999, P=0.000$), and the clinical diagnoses therefrom derived were perfectly matched. FT₃ level in ordinary dry vacuum tubes, however, was significantly higher than that in the tube containing heparin lithium ($t=-6.253, P=0.000$), but still close correlation was observed between them ($r=0.999, P=0.000$). Inconsistent clinical decisions occurred in 7 of the 32 subjects in respect of FT₃ levels respectively assayed in the 2 tubes, but when the normal ranges of FT₃ level were established for the 2 tubes separately, the same clinical diagnoses were reached. Conclusion TSH and FT₄ levels as determined in the 2 tubes are comparable, and even though FT₃ levels does not present this feature, closer relation is obvious and therefore the 2 values can be equivalent after establishment of their respective normal limits or after linear regression processing.

Key words: thyroid function test; chemoluminescence immunoassay; anticoagulant; heparin lithium

体外甲状腺功能试验中测定 FT₃、FT₄、TSH 一般采用血清标本,因为过去最主要的测定方法是放射免疫分析,标本通常是成批处理。静脉穿刺收集标本后可以先放置一定的时间,处理前已经有了足够的凝集时间,采集血清标本是比较合理的。目前各种标记免疫分析的方法相继被引入临床,更强调标本的快速,随时处理。标本采集后通常应立即送往实验室,否则运送过程容易引起溶血,特别是由患者本人或陪人运送标本时尤其如此。而抗凝标本容易处理,且不容易发生溶血,故此种情况下多用抗凝标本。本研究旨在探讨肝素锂抗凝真空管能否与普通干燥采血管通用,肝素锂抗凝标本能否取代原来的血清标本。

1 资料与方法

1.1 研究对象

随机取 32 例受检者,其中正常志愿者 10 例,甲亢¹³¹I 治疗前 9 例,甲亢¹³¹I 治疗 3~5 月 10 例,甲低患者 3 例。

1.2 试剂与仪器

FT₃、FT₄ 和 TSH 分析药盒及 Access 化学发光自动免疫分析系统均由 Bechman 公司提供。

1.3 方法

每一受检者同一次肘静脉穿刺采血 6 毫升,分装于肝素锂真空管、肝素管、普通干燥真空管、管各 3 毫升,室温下静置 10min 后离心 5min,取足量上清液置于标本检测杯,同时上机测定 FT₃、FT₄ 和 TSH。其余过程均由 Access 化学发光免疫分析系统自动完成。

1.4 资料处理与分析

收稿日期 2001-02-16

作者简介:何国荣(1965-),男,湖南岳阳人,1998年毕业于协和医科大学,主治医师,副主任医师,电话 20-61643885, e-mail: hegr@fimmu.com

定量与定性分析相结合对相关的数据进行量的比较和诊断结果的定性比较。按相关分析分析每 2 组之间的相关性并进行线性回归分析。以配对 t 检验进行 2 组数据的差异检验。

2 结果

2.1 肝素抗凝对 TSH 测定的影响

32 例血液标本的测定值范围。肝素管与干管均为 0.01~34.35IU/ml。完全一致。经 Student t 检验。两组测定值之间无差异 ($t=1.846$, $P=0.075$)。2 组数据高度相关 ($r=0.9969$, $P<0.001$)。以本实验室 TSH 的诊断标准 0.34IU/ml 为下限, 6IU/ml 为上限。二者对甲状腺功能的评价结果完全一致。均是甲状腺机能低下 7 例, 甲状腺机能正常 9 例, 甲状腺机能亢进 16 例。

2.2 肝素抗凝对 FT₃ 测定的影响

2.2.1 与干管标本的差异性分析 在所有 32 例标本中, 除 1 例 2 种采血管均超出测定范围, 结果均 >45.62 pmol/L。其余 31 例的测定值明显不同。肝素管的测定结果均低于干管的测定结果。绝对值相差最大为 16.44pmol/L, 最小为 0.76pmol/L。经 Student t 检验, 两组测定值之间存在显著性差异 ($t=-6.253$, $P=0.000$)。绝对值相差与 2 组测定值分别呈正相关。与肝素管收集标本测定值的 $r=0.9291$, 与干管收集标本测定值的 $r=0.9669$ 。相对相差最大为 57.5%, 最小为 15.6%。相对差异与 2 组测定值相关性不显著。测定值分别为 -0.2643 与 -0.1698。

2.2.2 与干管标本的相关性分析 2 组测定值具有高度相关性 ($r=0.9927$, $P<0.001$)。其 FT₃ 测定值的相关关系如图 1 所示。

2.2.3 与干管标本的回归分析 从图 1 可见, 两组 FT₃ 的测定呈直线分布。因此采用直线回归模式, 分别进行包含常数项和不包含常数项的回归分析。其回归方程分别如下:

包含常数项的回归方程: $Y=1.438X + 0.07385$

不含常数项的回归方程: $Y=1.443X$

Y 为肝管的 FT₃ 测定值, X 为肝素管的测定值。经 F 显著性检验, 此二回归方程均有显著性意义。前者 $F=1973.575$, $P=0.000$; 后者 $F=5042.444$, $P=0.000$ 。包含常数项的回归方程中, 常数项经 t 检验, 没有显著意义 ($t=0.188$, $P=0.853$)。因此, 不含常数项的回归方程更合适。

2.2.4 两组数据的诊断结果比较 以本实验室为干管建立的 FT₃ 诊断标准 6.7~10.32pmol/L 为二者的共同标准评价甲状腺功能。32 例受检者中, 二者结果一致者为 25 例, 其中甲亢 8 例, 甲低 3 例, 正常 14 例。不一致者 7 例, 其中 6 例干管的测定值判定为甲亢, 而肝素管的测定值判断为正常, 1 例干管判断为正

常, 而肝素管判断为甲低, 不一致者占 21%。两组测定值对甲状腺功能的评价结果有显著差异。若根据回归方程确定肝素自己的正常范围 5.4~7.15 pmol/L, 则二者的判定结果完全一致。4 例甲亢, 5 例甲低, 5 例正常。

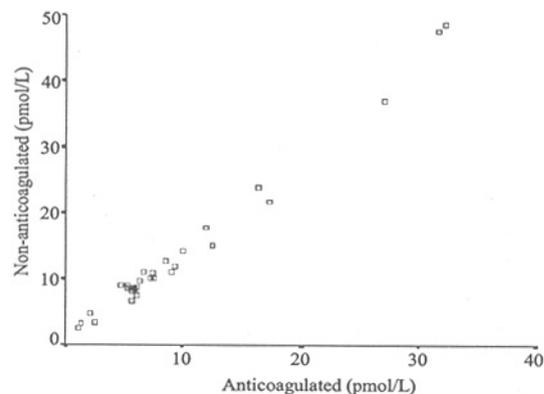


图 1 肝素抗凝管与普通干管采血各自 FT₃ 化学发光自动免疫分析测定值的相关关系

Fig.1 Relationship between FT₃ values assayed by chemiluminescence immunoassay in samples obtained from the same patient, collected in normal dry tubes and heparin lithium tubes respectively

2.3 对 FT₄ 测定的影响

32 例血液标本的测定值范围。肝素管为 1.29~58.57pmol/L, 干管为 1.35~56.57pmol/L。最大相差 1.79pmol/L。经 Student t 检验, 两组测定值之间无差异 ($t=0.057$, $P=0.972$)。两组测定值具有高度相关性 ($r=0.9993$, $P<0.001$)。以 7.5pmol/L 为下限, 1.1pmol/L 为上限评价甲状腺功能。2 例患者评价结果完全一致, 甲状腺机能低下 9 例, 甲状腺机能正常 15 例, 甲状腺机能亢进 8 例。

3 讨论

本研究探讨了肝素锂抗凝真空管采血对血液 TSH、FT₃ 及 FT₄ 测定的影响。结果表明, 与普通干燥管相比, 肝素锂抗凝对 TSH 及 FT₄ 的测定不产生任何影响, 结果完全一致。但 FT₃ 的测定值明显降低, 导致 21% 的患者误判, 严重影响对甲状腺功能的准确评价。在甲状腺机能亢进的诊断中, FT₃ 的测定尤为重要。因为血清中 FT₃ 比 FT₄ 诊断甲亢更为敏感。肝素管使 FT₃ 的测定值显著减低, 从而使其诊断甲亢的灵敏度显著降低, 可能将相当大的一部分甲亢患者判断为正常。以本研究为例, 普通干燥管采血时 14 例患者判断为甲亢, 而使用肝素管采血时仅 8 例判断为甲亢, 即有 44.44% 的甲亢患者被诊断正常。因此, 两种采血管不能通用。

本研究结果还表明, 虽然两种采血管采血所测定的 FT₃ 结果显著不同, 但二者之间却高度相关, 相关

系数达 0.999 二者是可以相互替代的，但不能采用统一标准，可以建立不同的诊断标准。通过回归分析建立回归方程进行数据处理。由于本研究受例数的限制，不可能通过一般正常值的途径建立。我们把普通管的正常值通过回归处理转换成肝素管的正常值。通过该标准来判断肝素管的测定值。结果与干管采用自己的标准进行的判定是完全一致的。

肝素锂抗凝真空管采血使 FT₃ 测定值降低的机制尚不明。有人报道体内应用肝素可使 FT₃ 与甲状腺球蛋白的结合力减低，而使血液中游离的 FT₃、T₄ 增加。本研究使用肝素抗凝管采血，相当于体外使用肝素，却没有出现类似体内的结果。一方面没有影响 FT₄ 的测定值，另一方面对 FT₃ 测定值的影响却相反，有升高反而降低。所以目前尚不能推断肝素锂对 FT₃ 测定的影响是通过改变 FT₃ 与甲状腺球蛋白的结合力所产生的。另外血浆蛋白与血清蛋白浓度的差异也不能对此做出解释。理由有三：①血清蛋白浓度低于血浆蛋白浓度，测定标本中蛋白浓度增加不足以影响免疫分析的定量。如果产生影响的话，由于蛋白浓度的增加，使非特异性结合增加，应该使测定值增高。②同一标本同时测定 3 种物质，又影响到 FT₃ 的测定，也很难用血浆与血清蛋白浓度的差异来解释。③两种测定值之间存在着高度相关性，两种侧测定值之间的绝对值差异与 FT₃ 的浓度呈高度正相关。如果该差异是由血浆蛋白浓度的差异产生的，则不会有这种相关性。因为血浆蛋白与血清蛋白浓度的差异不会随甲状腺激素浓度的改变而改变。另外，同样是在血浆样品，由于抗凝的方法不同，采用同样的方法

测得的结果也会产生显著性差异。正如文献报道，肝素对标记免疫分析的影响，肝素的影响存在与否，程度高低很不一致。因为方法与检测项目的不同而不同。因此，我们认为肝素对化学发光自动免疫分析体外测定五项甲状腺功能指标的影响差异是由于方法学上的差异所致，而不是对测定物质本身的影响。

参考文献

卢佩章. 核医学激素测定在甲状腺激素中的应用. 国外医学. 放射医学核医学分册, 1995, 19(2): 49.

Wenzel KW. Pharmacological interference with in vitro tests of thyroid function. *Metabolism*, 1981, 30(7): 717-32.

Hegstad RL, Johnston SD, Pasternak DM, et al. Effects of sample handling on adrenocorticotropin concentration measured in canine plasma, using a commercially available radioimmunoassay kit. *Am J Vet Res*, 1990, 51(12): 1941-7.

Thavasu PW, Longhurst S, Joel SP, et al. Measuring cytokine level in blood. Importance of anticoagulants, processing and storage conditions. *Immunol Methods*, 1992, 153(1-2): 115-24.

Noonan K, Kulu ME, Holownia P, et al. Effects of different storage temperature, sample collection procedures and immunoassay methods on osteocalcin measurement. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1996, 34(10): 841-4.

Michelangeli VP, Heyma P, Colman PG, et al. Evaluation of a new, rapid and automated immunochemiluminometric assay for the measurement of serum intact parathyroid hormone. *Ann Clin Biochem*, 1997, 34(Pt 1): 97-103.

Hutchesson AC, Hughes SV, Bowden SJ, et al. In vitro stability of endogenous parathyroid hormone-related protein in the blood and plasma. *Ann Clin Biochem*, 1994, 31(Pt 1): 35-9.

(责任编辑 隋金星)

连接 718 页

果差 0 和 20 Hz 的刺激效果相近。当刺激频率增加到一定值后，再增加刺激频率对癫痫的控制效果无明显的增强作用。因此，迷走神经刺激应采用有效的较低频率，以减少刺激副作用及延长电池寿命。目前临床应用的迷走神经刺激频率较高，0 Hz 是否最佳还有待临床进一步验证。从动物试验来看，该频率偏高。只有对迷走神经刺激抑制癫痫的机制深入研究，对最佳刺激参数和时机作进一步探索，才能使迷走神经刺激对癫痫有理想的控制作用。由于癫痫是大脑异常电活动的临床症候群，因此应用癫痫的不同层次，不同指标进行研究。本研究提供从动物行为、脑电图、肌电、单细胞记录等不同水平和指标的研究方法。

参考文献

Schachter SC, Saper CB. Vagus nerve stimulation. *Epilepsia*, 1998, 9(7): 677-86.

DeGiorgio CM, Schachter SC, Handforth A, et al. Prospective long-term study of vagus nerve stimulation for the treatment of refractory seizures. *Epilepsia*, 2000, 41(9): 1195-200.

Rutecki P. Anatomical, physiological, and theoretical basis for the antiepileptic effect of vagus nerve stimulation. *Epilepsia*, 1990, 31(Suppl 2): S1-S6.

解学孔. 癫痫病学. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 236-8.

Sunderam S, Osorio I, Watkins JF, et al. Vagal and sciatic nerve stimulation have complex, time-dependent effects on chemically-induced seizures: a controlled study. *Brain Res*, 2001, 918(1-2): 60-6.

Lothman EW, Hatlelid JM, Zorumski CF, et al. Kindling with rapidly recurring hippocampal seizure. *Brain Res*, 1985, 360(1): 83-7.

Terry RS, Tarver WB, Zabara J. A implantation of neurocybernetic prosthesis system. *Epilepsy*, 1990, 31(Suppl 2): S33.

欧阳辉, 漆松涛, 邱炳辉, 等. 迷走神经刺激术治疗顽固性癫痫. *第一军医大学学报*, 2000, 20: 68-9.

Ouyang H, Qi ST, Qiu BH, et al. Vagal nerve stimulation treatment of refractory epilepsy. *First Mil Med Univ*, 2000, 20(6): 568-9.

HIV基因芯片的初步研究

李 凌¹ 袁文丽¹ 袁向明¹ 袁 骥¹ 袁文岭² 渊第一军医大学分子生物学研究所 袁生物芯片全军重点实验室 袁东 广州 510515 曰 广州军区广州总医院分子肿瘤学研究所 袁东 广州 510010 冤

摘要 目的 建立 HIV 基因检测芯片的分析技术遥方法 分离 HIV1U26942 基因限制性显示片段作探针袁应用 PixSys 5500 点样仪将探针打印在氨基包被的玻片上制作基因芯片袁然后与随机引物荧光标记的 HIV 样品进行杂交袁以分析限制性显示基因片段的杂交动力学遥经杂交后清洗和干燥袁扫描芯片进行检测遥结果 对基因检测芯片的制作与检测的实验条件进行了初步研究并筛选了 12 个限制性显示基因探针遥结论 建立的检测芯片的实验方法可行且较特异遥

关键词 基因芯片 曰 DNA 微矩阵 曰 HIV 感染 曰 限制性显示

中图分类号 豫 373:Q75 文献标识码 豫 文章编号 院 000-2588(2002)08-0724-04

Preliminary study of development of gene chips for HIV diagnosis

LI Ling¹, MA Wen-li¹, MAO Xiang-ming¹, ZHU Ji¹, ZHENG Wen-ling²

¹Institute of Molecular Biology and Key Laboratory of Biochip of PLA, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To study the technology for establishing DNA chips for the diagnosis of HIV. Methods HIV1U26942 DNA fragments were isolated by restriction display-PCR (RD-PCR) and printed onto aminosilane-coated glass slides by Pixsys 5500 arrayer as probes to prepare the gene chips. HIV samples, after labeled with Cy3, were hybridized with the microarray followed by scanning for analysis of hybridization kinetics of the RD fragments. Results The experimental condition for preparing the gene chips was investigated and 12 RD fragments were screened as probes for further study. Conclusion The technique established in this study for preparing DNA chips is specific and applicable.

Key words: gene chips; DNA chips; DNA microarrays; HIV infection; restriction display

艾滋病渊IDS冤是由人类免疫缺陷病毒渊HIV冤感染所引起袁由于其危害的严重性和特殊性袁以及治疗尧预防效果差袁因此需要一种高效尧敏感尧特异的方法对该病进行早期诊断遥我们尝试将近年来发展迅速的基因芯片技术渊应用用于 HIV 感染的检测遥目前 HIV 分为 HIV-1 和 HIV-2 两型袁其中 HIV-1 型的流行范围较广遥该型包括 A~J 等 11 个亚型袁在我国以 B 尧 B₁ 亚型为主遥本文着眼于 HIV-1B 亚型基因的检测袁对基因芯片的制备尧杂交尧检测等过程进行了初步研究袁为疾病诊断芯片的研制及应用打下基础遥

1 材料与amp;方法

1.1 材料

HIV-1B 亚型质粒 HIV1U26942 由美国 Jean K Carr 博士渊the Henry M. Jackson for the Advancement of Military Medicine 袁 Maryland 冤惠赠遥 Klenow 片段尧 dNTP 及 PCR 试剂购自大连宝生物工程有限公司 曰

甲基亚砷渊MSO冤购自上海生工生物工程有限公司 曰 Cot-1 DNA 渊mg/ml冤购自 GIBCO BRL 曰 引物二羧菁渊aniline 冤³ 标记的 dUTP 购自 Amersham Pharmacia 遥

PixSys 5500 型基因芯片打印仪购自 Cartesian Technologies 公司 曰 紫外交联仪购自 BIO-RAD 曰 ScanArray Lite 扫描仪购自 GSI Lumoncis 公司 曰 CMT-GAPSTM 氨基硅烷包被的玻片尧杂交盒购自 Corning 公司 遥

1.2 HIV 基因芯片的制备

1.2.1 探针的制备 应用限制性显示 PCR 渊restriction display polymerase chain reaction 冤 RD-PCR 冤技术渊制备短的基因片段作为探针袁具体方法如下院从质粒上分离 HIV 基因后袁用 Sau3A 酶切袁得到多个大小合适的限制性酶切片段遥然后在这些片段两端接上接头袁根据酶切位点尧接头的序列设计通用引物遥在该通用引物的 3' 端分别延伸一个碱基后袁通过引物间的两两组合袁将 PCR 反应分成 10 个亚组遥纯化各组 PCR 产物袁克隆到 T 载体上遥阳性克隆经鉴定尧扩大培养后提取质粒袁以质粒为模板扩增靶片段并进行序列分析遥

1.2.2 探针的打印及打印后处理 应用 PixSys 5500

收稿日期 院 002-01-11

基金项目 院 广东省自然科学基金 渊84092冤 广州市重点科技攻关项目 渊90448022冤

作者简介 李 凌 渊973-冤男 袁福建长汀人 袁 1995 年毕业于第一军医大学 袁在读博士 袁电话 院 20-61640114-89098 袁 e-mail: lilings@fimmu.edu.cn

型基因芯片打印仪将探针有序地打印在玻片上。打印后将玻片置于 90mj 的紫外光下使 DNA 交联在玻片表面。然后 80 益干烤 2 h。

1.3 样品的荧光标记

采用随机引物延伸法标记样品。取 200ng 的 HIV 全长基因与 75ng 随机引物混合煮沸 3min。然后冰浴 5min。加入 0.5 滋 dNTP 混合液 (dATP, dGTP, dCTP 各 5 mmol/L, dTTP 1 mmol/L)。0.5 滋 Cy3-dUTP 1mmol/L。0.5 滋 Klenow Fragment 缓冲液 1 滋 Klenow 片段 1U。加入 ddH₂O 至 10 滋。7 益温育 2~3h。5 益灭活 5min 后以乙醇沉淀法纯化。

1.4 分子杂交与杂交后清洗

1.4.1 预杂交 将预杂交液 (5% 甲酰胺, 0.1% SDS) 预热至 42 益。放入玻片。2 益温育 45min。分别用水, 异丙醇清洗玻片。然后甩干玻片。或用 N₂ 吹干。

1.4.2 杂交 将荧光标记的样品与 2 伊杂交液 (10% 甲酰胺, 0.1% SDS, 0.2% Cot-1DNA) 混合。95 益变性 5min。以最大转速离心 2min。将玻片放入杂交盒。加入适量上述样品至玻片表面。小心盖上盖片。避免产生气泡。同时在盒内两个小孔中加入 10 滋 ddH₂O 以保持湿度。装上杂交盒。置于 42 益水浴中杂交 3~12 h。

1.4.3 杂交后清洗 玻片朝上打开杂交盒。取出芯片。立即浸入杂交后清洗液中。先以 42 益预热的 2 伊 SC + 1g/LSDS 清洗 5min。再移入 0.1 伊 SC + 1g/LSDS 的溶液中室温清洗 10min。最后移入 0.1 伊 SC 清洗 1min。重复 4 次。以去除 SDS。空气干燥或用 N₂ 干燥玻片。

1.5 检测分析

1.5.1 扫描分析 用 ScanArrayLite 扫描仪扫描芯片。以 QuantArray 微集阵列分析软件分析杂交点阵。Cy3 的荧光强度。

1.5.2 统计学处理 用 SPSS 10.0 软件采用方差分析。再以 Student Newman-Keuls (NK) 法进行两两比较。P < 0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 基因探针的制备与检测

将 HIV1U26942 基因 RD-PCR 产物克隆到 T 载体后。提取质粒。以质粒为模板扩增得到 30 个 100~750bp 的限制性显示型基因片段。经异丙醇纯化后溶于 50% DMSO。50ng/滋。取出少量进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。图 1 所示均为单一片段。用作制备 DNA 芯片的探针。

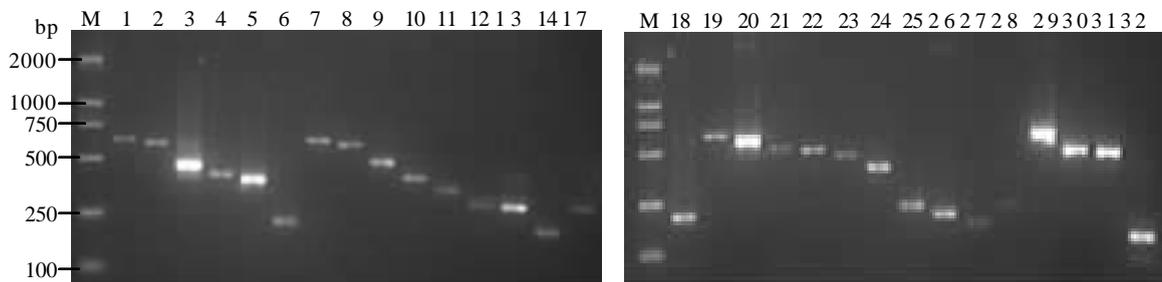


图 1 限制性显示扩增的限制性片段

Fig.1 Restriction fragments amplified by restriction display-PCR
M: DNA marker DL2000; 1-32: The number of the fragment

2.2 基因芯片的打印方式

基因芯片的打印方式设计为 16 伊 6 的阵列。打印在约 0.25 cm² 的玻片上。约 10 伊 10 伊 P 行打印 HIV-1B 基因探针。共 30 个。每行打印两个探针。每个探针打印 8 个点。

2.3 芯片杂交结果分析

将 HIV 样品以随机引物法进行荧光标记。纯化后加入杂交液与芯片进行杂交。经杂交后清洗和干燥。扫描芯片进行检测。重复 8 次实验。结果基本一致。由图 3 可见。来自荧光标记的 DNA 片段。特异性地与芯片中大部分相应的位点发生杂交。呈现阳性杂交信号。而与对照 HCV 基因点阵及空白点阵杂交的信号很弱。结果证实了该芯片的可行性和特异性。

计算每张芯片上每个探针 8 个点的荧光强度的平均值。对 8 张芯片上 32 个探针的荧光强度进行配对组方差分析。可知这些探针荧光强度的差异显著。P = 7.542 < 0.001。两两比较后根据荧光强度的大小。从中选择了探针 17, 1, 1, 7, 8, 9, 9, 0, 8, 8, 32, 2, 0。共 12 个探针。分析其序列。GC 含量。m 值。结果表明。这些探针的大小在 100~600 之间。GC 含量较高。在 40% 左右。m 值为 4.6~49.8。m 值为 85 左右。探针分布在该基因组的不同区段。

3 讨论

DNA 芯片是国际上兴起的一种基因检测与分析新技术。通过将基因探针显微固化在 1 平方厘米

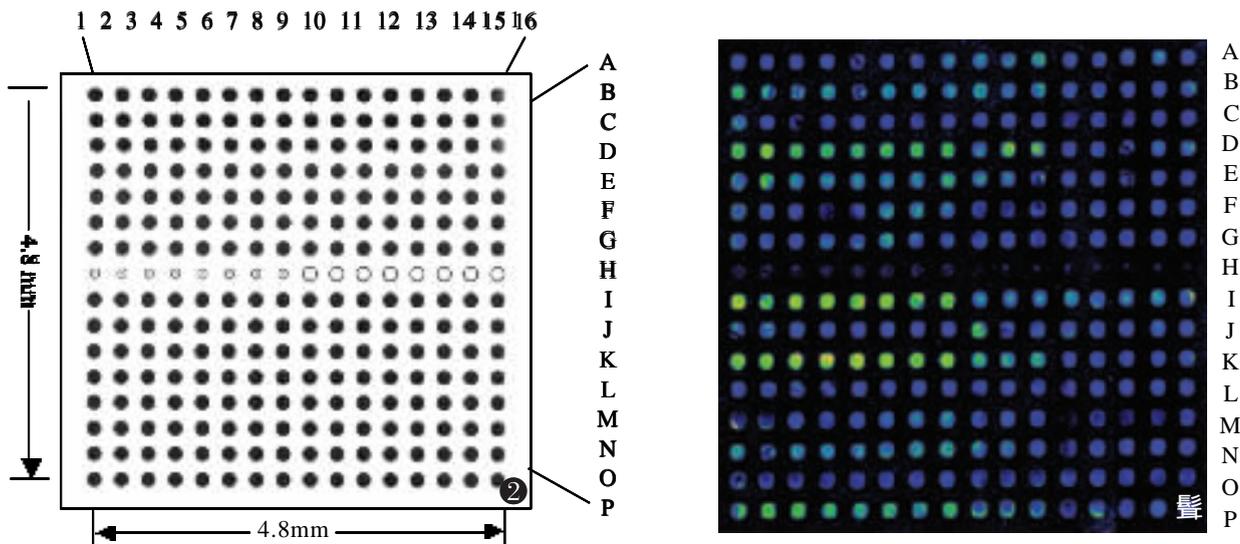


图 2 芯片的打印方式

Fig.2 Format design of HIV gene chip

A₁-A₈: Probe 1; A₉-A₁₆: Probe 2; B₁-B₈: Probe 3; H₁-H₈ (probe 15): HCV gene fragments subtype (b), negative control; H₉-H₁₆ (probe 16): 50% DMSO, blank control space between spots is 300 μm

图 3 HIV 基因芯片的杂交图

Fig.3 Hybridization of HIV gene chip with HIV sample

The color ranging from blue to red which followed the change of spectrum represents gradual fluorescent intensity increment. For example, probe 17 (I₁-I₈) is strongest and followed by probe 21 (K₁-K₈), probe 31 (P₁-P₈) and so on

大小的固相支持物上袁不仅节约了试剂与样品袁而且将节省大量的人力尧物力与时间袁使基因检测更为快速尧敏感和精确遥基因芯片技术要点主要包括四个方面院芯片的制备尧样品的准备尧分子杂交和检测分析遥其中探针的制备及芯片杂交动力学分析最为关键遥

目前病原基因检测芯片常用分子克隆结合 PCR 的方法去扩增一个或少数几个短探针或全长基因作探针袁但是以一个探针检测一种靶基因容易产生假阳性尧假阴性结果袁且全长基因探针杂交的条件不易控制遥我们应用本实验室创新的限制性显示渊RD-PCR冤技术快速分离并扩增得到许多大小相近 渊200~600bp冤的基因片段作探针袁以这些探针来检测同一个靶分子可显著提高信噪比袁显著降低假阳性率遥扩增的探针溶于 50% DMSO 而不采用常规的 SSC 来溶解袁是因为 DMSO 可使 DNA 变性成单链以便于杂交袁而且可防止打印时探针溶液的蒸发遥由于采用的是双链探针袁其浓度不宜过低或过高渊过高会因为双链探针自身的复性而影响杂交冤袁我们的实验结果表明采用 250 ng/μl 的探针可取得较满意的杂交效果遥打印的介质选用氨基包被的玻璃片袁一方面氨基在中性条件下带正电可与 DNA 上带负电的磷酸基团以离子键结合袁另一方面袁以紫外线照射及加热干烤作用后袁可使 DNA 探针上的胸腺嘧啶残基和烷基胺上的碳之间以自由基作用形成非特异偶联袁从而使 DNA 固定在玻片上遥

样品的制备包括扩增尧标记等步骤遥通常在随机引物延伸或逆转录 -PCR 等扩增过程中掺入荧光标记物袁这两种方法常用于基因表达谱芯片的研究遥本实验采用随机引物延伸的标记方法效果也较好遥为进一步提高标记的灵敏度袁实现杂交信号的放大袁并简化标记的步骤袁我们正应用 RD-PCR 技术研究样品荧光标记的新方法遥

分子杂交也是芯片技术的关键步骤之一遥虽然上述制备的限制性显示基因片段大小相近袁但仍存在一定的差异遥所以需要摸索合适的杂交条件袁分析它们的杂交动力学遥实验中我们采用含 25% 甲酰胺尧伊 SSC 等的杂交液尧2 益杂交的体系遥杂交结果显示大部分片段的杂交信号较强袁而阴性对照尧空白对照均不杂交遥经过统计学处理后袁从中选定了 12 个合适芯片杂交的片段作为探针遥这些片段长度较短袁 GC 含量尧 Tm 值均较高遥而且它们在 HIV 基因组中分布较广泛袁这对靶分子的检测具有重要意义遥

杂交及清洗后袁带有荧光标记的样品 DNA 与其互补的 DNA 探针形成杂交体袁在激光激发下产生一个荧光信号遥以 ScanArray Lite 扫描仪对荧光信号进行扫描袁该扫描仪利用的是激光共聚焦的原理遥扫描结果表明袁杂交的信号较强而背景低遥荧光标记样品的纯化不彻底渊未掺入的 cy3-dCTP冤非特异性位点的封闭不完全袁杂交后清洗不充分尧清洗后玻片上残留液滴和玻片上灰尘污染等均可能会增强杂交背景遥

16例渊9%冤胸腹壁静脉曲张 47例渊8%冤胆囊炎 47例渊8%冤门脉高压症状有腹膨 51例渊3%冤肝肿大 47例渊8%冤脾肿大 33例渊1例冤腹水 46例渊7%冤食管静脉曲张 29例渊6%冤上消化道出血 14例渊7%冤黄疸 6例渊4%冤脐疝 3例渊7%冤胆囊壁增厚 52例渊4%冤心肺功能障碍有院心慌 4例渊%冤乏力 19例渊3%冤其他症状有腹痛 16例渊0%冤纳差 17例渊1%冤泌尿系症状 6例渊4%冤

1.3 诊断和治疗

本组 81 例 BCS 均行彩超和 DSA 检查袁例行 CT 检查袁例行 MRI 检查袁例行经皮肝穿刺活检遥确诊为 W 型 26 例尧 B 型 18 例尧 F 型 37 例遥 8 例经 DSA 检查后直接行经皮经腔血管成形术袁其中球囊导管扩张成功 5 例袁失败 1 例袁例行血管内支架置入袁例行激光血管成形术失败曰外科手术治疗 38 例袁其中脾-肺固定术 13 例尧下腔静脉梗阻根治术 5 例尧下腔静脉-右心房人工血管转流术 15 例尧肠系膜上静脉-下腔静脉侧侧吻合术 5 例遥

1.4 影像表现

1.4.1 彩超检查 主要表现为脾影增大袁其以尾状叶增大明显袁回声弥漫性增强曰肝静脉狭窄尧闭塞或扩张袁肝内尧肝外广泛侧支循环形成曰肝上和 / 或肝后段下腔静脉狭窄或闭塞袁狭窄段血流加速袁远端下腔静脉扩张尧血流缓慢袁腔静脉壁增厚曰可见腹水尧脾脏肿大遥 52 例有明显胆囊壁增厚遥

1.4.2 CT 检查 继发性 2 例袁其中 1 例为腹膜后纤维肉瘤压迫下腔静脉袁 1 例为平滑肌肉瘤肝脏尧腔静脉转移遥 例原发性 BCS 患者表现为肝脏影增大尧肝叶增生明显袁扫描见肝内大片密度减低区袁并有更低密度区袁增强扫描低密度区无强化遥

1.4.3 MRI 检查 肝脏轮廓不完整袁尾叶明显增大袁肝内散在短 T₂ 信号遥肝内血管迂曲纤细尧腔静脉狭窄袁门脉粗细不均袁腹膜后侧支静脉曲张尧腹水尧脾肿大遥

1.4.4 经皮肝穿刺活检 镜下见肝细胞肿胀袁排列疏松袁局灶坏死袁肝窦淤血扩张袁纤维组织增生遥

1.4.5 DSA 表现 本组 81 例全部做 DSA 检查袁其中下腔静脉双向插管造影 22 例遥结果如下院 B 型 26 例袁其中下腔静脉膜性阻塞 11 例袁节段性狭窄 7 例袁静脉炎或血栓形成 6 例袁肿瘤侵犯尧压迫引起狭窄 2 例曰 W 型 18 例袁其中肝静脉膜性阻塞 3 例袁狭窄或阻塞 15 例曰 F 型 37 例遥

2 讨论

BCS 主要临床表现为下腔静脉梗阻和门脉高压症状袁发病年龄以 20~40 岁多见袁男性略高于女性遥该病需与肝硬化门脉高压和下腔静脉瓣膜功能不全所致的下肢静脉曲张鉴别袁影像学检查有助确诊遥

超声检查无创伤袁简便易行袁可以多方位尧多层次地观察腔静脉和肝静脉袁可直接显示静脉阻塞部位尧狭窄长度尧静脉壁厚度尧有无血栓和梗阻远端情况袁也可以观察下腔静脉周围病变遥经血管造影证实袁诊断符合率在 90% 左右袁彩超检查可以做为 BCS 诊断的首选方法遥 MRI 尧 CT 对 BCS 检查也有一定的诊断价值遥本组病例经超声尧 MRI 尧 CT 检查发现袁 2 例显示胆囊壁增厚曰 CT 检查的 8 例中袁除 2 例为继发性 BCS 外袁

例原发性 BCS 中 4 例表现为胆囊壁增厚遥笔者认为袁由于胆囊床有多只小静脉直接穿入肝实质袁注入肝静脉袁其余部位的静脉则在胆囊颈汇集成 1~2 条胆囊静脉袁然后汇入门静脉右干遥肝静脉无静脉瓣袁当下腔静脉或肝静脉梗阻时袁引起肝静脉压升高袁从而导致门静脉高压袁胆囊静脉回流受阻袁胆囊壁产生淤血肿胀袁在扫描图像上显示胆囊壁增厚遥因此袁胆囊壁增厚可以认为是 BCS 的一个间接征象遥

DSA 是本病诊断的可靠方法袁可以直接显示下腔静脉阻塞的类型尧位置尧长度遥当下腔静脉完全阻塞时可采用双向插管造影来观察阻塞段长度遥 DSA 可提示本病病理形态的大体分型袁下腔静脉双向插管造影对下腔静脉完全阻塞的诊断十分重要袁对膜性病变的诊断尤为可靠遥 BCS 病变类型较多袁国内外有多种分类方法遥笔者将 BCS 分三型袁即单纯肝上段下腔静脉阻塞或狭窄尧肝静脉通畅曰 B 型曰单纯肝静脉阻塞或狭窄曰 F 型曰混合型袁肝上段及 / 或肝段下腔静脉阻塞或狭窄合并肝静脉阻塞或狭窄遥笔者认为该分型方法简捷尧明了袁可以准确反映病变情况袁对治疗方案的制订和选择有重要指导意义遥

BCS 的治疗方法很多袁内科治疗多属无效的保守治疗遥 Ahn^[1]认为如仅行内科治疗袁年内死亡率达 50% 以上遥外科手术须根据不同的病变类型袁选择不同的手术方法遥根据我们的分型情况袁 B 型可首选直接血管腔内成型袁无法行经皮穿刺球囊扩张术渊PTA冤或 PTA 失败袁可行下腔静脉阻塞根治术或下腔静脉-右心房人工血管转流术曰 W 型可选择各种门-腔分流法尧肠系膜上静脉-下腔静脉分流术尧脾静脉-下腔静脉分流术等曰 F 型可行脾-肺固定尧肠-房分流尧脾-房分流等遥在诸多的治疗方法中袁介入治疗以创伤小尧治疗及时尧效果好等优点逐渐被人们认可袁但值得注意的一个问题是血栓脱落产生可肺梗塞遥杨学良^[2]报道 20 例 BCS 患者中有 1 例因肺栓塞死亡袁 1 例造影诊断为 BCS 后未立即扩张治疗袁扩张前造影发现下腔静脉内血栓形成袁失去介入治疗机会遥本组 8 例均是在造影诊断的同时立即行介入治疗袁 1 例产生血栓袁后常规服用抗凝药物遥尽管 PTA 被认为是安全尧有效尧创伤小的治疗手段袁但有较高的狭窄复发率袁多次重复行 PTA 遥血管内支架治疗 BCS 虽是近年来出现的一种治疗手段袁已显示出广阔的应用前景袁该法可减少 PTA 后血管痉挛尧内膜撕裂等导致的急性闭塞袁并可防止因纤维内膜增生引起的慢性闭塞或再狭窄遥

参考文献

咱暂 Ono J, Sakoda, Kowada T, et al. Membranous obstruction of the inferior vena cava 咱暂 Ann Surg, 1983, 187(2):454-8.
 咱暂 Nakao K, Adachi S, Kawashima Y, et al. Aradical operation for the Budd-chiari syndrome associated with obstruction of the inferior vena cava 咱暂 J Cardiovasc Surg, 1984, 25(3):216-21.
 咱暂 Ahn SS. Selective surgical therapy of the Budd-chiari syndrome provides superior survival rate than conservative medical management 咱暂 Vasc Surg, 1987, 5(2):28-36.
 咱暂 杨学良. 经皮球囊导管成形术治疗下腔静脉膜性阻塞症 咱暂 中华外科杂志, 1993, 5(5):578.
 咱暂 Dotter CT. Transluminally placed coils spring endarteriary bypass grafts: long-term patency in canine popliteal artery 咱暂 Invest Radiol, 1969, 4(6):329-32.

定量分析两种治疗方案与危险指数对慢性髓系白血病临床缓解率的影响

杜庆锋 袁晓力 袁启发 袁荣 袁琪 袁淑芸 渊第一军医大学南方医院血液科 冤 广东 广州 510515 冤

摘要 院目的 定量分析两种治疗方案与危险指数对慢性髓系白血病 渊ML 冤临床缓解率的影响遥方法 按治疗方案与 Sokal 危险指数分别进行分组 冤定量分析三尖杉酯碱联合阿糖胞苷 渊Ara-C 冤与羟基脲 渊Hu 冤二种治疗方案和病人初诊时所处的危险度对慢性期 CML 患者所获临床疗效的影响遥结果 尽管 HA 方案治疗初诊 CML 慢性期患者的近期疗效优于 Hu,但它并不能延长病人的慢性期维持时间 渊DCP 冤而且病人的危险指数对完全缓解率 渊CR 冤所需时间及 DCP 的影响均远超出治疗方案的作用遥结论 HA 方案不能延长病人的 DCP 冤不宜作为初诊 CML 慢性期患者的一线治疗方案 渊按危险指数将病人作出合适分层 冤有利于治疗方案的合理选择及科学评价遥

关键词 院三尖杉酯碱 羟基脲 Sokal 危险指数 慢性髓系白血病

中图分类号 院 R733.72 文献标识码 院 A 文章编号 院 000-2588(2002)08-0729-02

Quantitative analysis of Sokal's risk index in relation to 2 therapy protocols: their respective impact on clinical remission of chronic myeloid leukemia

DU Qing-feng, LIU Xiao-li, LIU Qi-fa, LI Rong, CHEN Qi, ZHOU Shu-yun

Department of Hematology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To quantitatively evaluate the impact of Sokal's risk index and that of 2 therapy protocols on the clinical outcome of patients with chronic myeloid leukemia (CML). Methods With the assistance of Access 2000 database of CML, 94 patients with CML were grouped on the basis of either different therapy protocols utilizing harringtonine plus Ara-C (HA) vs hydroxyurea (Hu) or Sokal scores, and the impact of therapy protocol and risk profile were quantitatively evaluated respectively. Result Treatment protocol utilizing HA was incapable of lengthening the duration of chronic phase (DCP) of CML, regardless of its better short-term effect than that of Hu. The impact of risk profile of the patients on clinical remission rate and DCP was more significant than that of the therapy protocols. Conclusion HA should not be used as the first-line protocol in the treatment of CML patients in chronic phase who have not received any previous medical intervention. Patients should be categorized according to their risk profile for choosing appropriate treatment protocol and making better clinical judgement.

Key words: harringtonine; hydroxyurea Sokal's risk index; cytosine arabinoside; chronic myeloid leukemia

我们利用本科构建的慢性髓系白血病 Access 2000 数据库 冤检索出符合条件的 94 例患者 冤分别按治疗方案与 Sokal 危险指数 冤进行分组 冤就两种因素对患者的缓解率 冤慢性期维持时间的影响进行了定量分析和初步探讨遥

1 材料与方 法

1.1 病例

94 例 CML 均符合 冤血液病诊断及疗效标准 冤规定的诊断标准和第二届全国白血病治疗讨论会 冤 989 冤分期标准提出的慢性期标准遥男 79 例 冤 15 例 冤年龄 16~65 岁 冤中位年龄 37.0 岁 冤按 Sokal 评分公式 院分值 =Exp{0.0116[年龄(岁)原 3.4]+0.0345[脾脏大小(厘米) - 7.5]+0.188[(血小板数 /700)2 - 0.563]} +0.0887(外周血原始细胞数 - 2.10) 冤评分值 <0.8 记

为 L 渊低危组 冤评分值 >1.2 记为 H 渊高危组 冤 冤 0.8~1.2 记为 M 渊中危组 冤 冤本组病人中 H 冤 1 冤组分别占 20 冤 1 冤 3 冤 例 冤 A 组 64 例 冤对照 Hu 组 30 例 冤遥

1.2 治疗方案

HA 方案应用见文献 冤袁 冤三尖杉酯碱 4mg/d 冤第 1~3 天静脉滴注 冤阿糖胞苷 渊Ara-C 冤使用剂量个体化 冤 00~400mg/d 冤静脉注射 冤一般用药 7~14 d 冤前 4 d 为 200mg/d 冤以后则根据外周血白细胞数及骨髓增生程度决定用药时间和剂量增减 冤完全缓解 渊CR 冤后巩固维持治疗 冤对照组单用羟基脲 渊Hu 冤 0.5~3.0g/d 治疗遥

1.3 疗效判定及统计分析

近期疗效以 冤血液病诊断及疗效标准 冤为依据 冤近期疗效分析中 冤患者按治疗方案和 Sokal 评分结果分别分组 冤观察两种分组方法中各组病人的慢性期维持时间 渊DCP 冤数据结果用 SPSS9.0 统计软件包进行 冤字检验统计分析或 Kaplan-Meier 生存分析遥

2 结果

2.1 近期疗效

收稿日期 院 002-01-15

基金项目 院 广东省自然科学基金 冤 70833 冤

作者简介 院 杜庆锋 渊 1976- 冤男 冤湖南双峰人 冤 1998 年本科毕业于第一军医大学 冤 袁 冤在读博士生 冤 电话 院 20-61641617

2.1.1 不同治疗组的近期疗效 见表 1

2.1.2 不同危险组病人的近期疗效 见表 2

表 1 不同治疗方案对慢性髓系白血病患者近期疗效

Tab.1 The clinical results in chronic myeloid leukemia patients in chronic phase with different treatment protocols

Groups	n	CRrate	Totalremissionrate
HAprotocol	64	41(64.0%)	90.5%(58/64)
Huprotocal	30	11(36.7%)	86.7%(26/30)

字= 6.202; P<0.05

表 2 不同危险组病人的临床疗效

Tab.2 The clinical results of chronic myeloid leukemia patients in different risk groups

Groups	n	CRrate	Totalremissionrate
Lowrisk	23	18(78.3%)	95.7%(22/23)
Medianrisk	51	31(60.8%)	92.2%(47/51)
Highrisk	20	3(15.0%)	75.0%(15/20)

字= 17.134; P< 0.001

2.1.3 定量分析治疗方案与危险组对 CR 率的影响
比较分析治疗方案与危险组对治疗后获 CR 率的影响发现危险组间 CR 率的差异远超过治疗组 HA 组 4.0% 与 Hu 组间 6.7% 间获 CR 率差值为 27.3 个百分点统计学有差异 $\chi^2 = 0.012$ 且低危险组 8.3% 与高危组 5.0% 间 CR 率差值达 63.3 个百分点统计学有显著差异 $P < 0.001$

2.1.4 定量分析治疗方案与危险组对获 CR 所需时间的影响
危险组间获 CR 所需时间的差异远超过治疗组 HA 与 Hu 组获 CR 所需时间差值为 10.9 d 而高危组与低危组间为 51.4 d 近前者的 5 倍高 且低各危险组内用 HA 或 Hu 治疗方案获 CR 所需时间差异分别为 2.3 和 2.2 和 6 d 而在 HA 和 Hu 治疗组内低 高危组获 CR 所需时间差异则分别为 47.9 d 和 51.6 d 为前者最大值的 4 倍多

2.2 远期疗效

2.2.1 不同治疗组的远期疗效 按 Kaplan-Meier 乘积极限法估计不同危险组及治疗组的 DCP 结果用时序检验(log-rank)比较按治疗方案分为 HA 组 64 人和 Hu 组 30 人 HA 组 DCP 的平均中位值 3.4 月 35.0 月 均低于对照组 4.5 月 1.0 月 两组 DCP 的中位值之差为 6.0 月 且无统计学差异 $P > 0.05$

2.2.2 不同危险组远期疗效 按 Sokal 评分结果分为 L 组 23 人 M 组 51 人及 H 组 20 人 L 组 DCP 的平均中位值 8.2 月 5.0 月 均显著高于 H 组 7.1 月 6.0 月 DCP 中位数的差值为 17 个月 有显著统计学差异 $P < 0.001$

3 讨论

自 70 年代羟基脲替代烷化剂马利兰及 80 年代 IFN- γ 用于治疗 CML 以来患者的预后有了较大的进步 尽管如此 研究结果表明 CML 对治疗的反应及生存预后仍很大程度上取决于病人的危险情况 但这一点并未引起临床及科研工作者的充分重视并应用于对治疗方案取舍及疗效的评价 HA 方案在我国于 80 年代用于治疗 CML 与羟基脲和马利兰比较它能更迅速地缓解病人症状并获较高的完全血液学缓解率 在本研究中我们发现 HA 方案治疗初诊 CML 病人确实有较理想的近期疗效 HA 组病人获 CR 率为 64.0%(41/64),总有效率达 90.5%(58/64) CR 率与对照组比较有统计学差异 但是当我们就治疗方案和危险组对病人获 CR 率的影响进行定量分析却发现本研究中最终影响获 CR 的关键因素是患者自身危险度情况 而非我们所观察的两种治疗方案 同样危险组情况对获 CR 所需时间的影响也要远大于治疗组

我们用 Kaplan-Meier 乘积极限法分别对两种不同分组方案对病人的慢性期维持时间进行了估计 结果用时序检验 log-rank 进行比较 发现两治疗组间 DCP 中位数差值为 6 个月 且有统计学差异 $P > 0.05$ 而危险组中 L 组中位 DCP 值远高于 H 组 5.0 月 vs 26.0 月 有显著统计学差异 $P = 0.000$ 两者的差值为 19 个月 为治疗组间差值的 3 倍余 结果提示病人 DCP 的长短更主要的是由病人当时所处的危险组来决定 这一结论不仅是针对本研究中的病人 即使对于目前临床上认为能够改善病人细胞遗传学症状 延缓病人急变的 IFN- γ 治疗也同样如此 后者对于 H 组病人疗效并不理想 此类病人应尽可能早考虑骨髓移植

对于慢性期 CML 患者初诊时治疗方案的选择应充分重视和考虑病人当时的危险情况 这样有利于合理选用治疗方案以减少治疗的盲目性 在对各种治疗方案进行疗效评价时 将病人按危险指数作出合适分层 不论在回顾性还是前瞻性研究中 都将利于我们作出更科学的结论

参考文献

咱暂 杜庆锋, 刘晓力, 赵智涛, 等. 尝试用 Access2000 创建慢性髓系白血病数据库 咱暂 中国医学教育技术杂志, 2002, 2: 121-3.
咱暂 Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. Prognostic discrimination in "Good-Risk" chronic granulocytic leukemia 咱暂 Blood, 1984, 63(4): 789-95.
咱暂 刘启发, 周淑芸, 陈云秋, 等. HA 方案剂量个体化治疗慢性粒细胞白血病加速期 咱暂 中华血液学杂志, 1992, 13(3): 151-2.
咱暂 徐兵, 周淑芸, 刘启发等. HA 方案个体化治疗老年人慢性粒细

应用 PCR 技术检测假肥大型肌营养不良

刘咏梅¹ 袁志纯¹ 袁方振伟² 第一军医大学珠江医院儿科袁广东 广州 510282 第一军医大学生化教研室袁广东 广州 510515 宽

摘要目的 应用 PCR 技术检测假肥大型肌营养不良 DMD/BMD 基因缺失和杂合子方法 根据 DMD/BMD 外显子缺失的多发位点建立一个多重 PCR 体系在不同的 PCR 条件下对 23 例 DMD/BMD 患者及其家系 57 名可疑女性携带者进行多重缺失的筛选单链构象多态性 SCP 冤异源双链分析 冤链标记分析 冤限制性片段长度多态性 FLPs 冤分析及微卫星分析遥结果 23 例先证者中有 14 例为基因缺失 冤例为基因重复 冤0 例家系中女性亲属为杂合型遥结论 利用此 PCR 体系可准确地检测出 DMD/BMD 的基因突变 冤可靠地筛选携带者并对其家系进行正确的分析遥

关键词 肌营养不良 分子生物学 基因诊断 PCR 技术

中图分类号 746.2 文献标识码 文章编号 000-2588(2002)08-0731-03

Application of PCR technique in genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy

LIU Yong-mei¹, FENGZhi-chun¹, FANGZhen-wei²

¹Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China;

²Department of Biochemistry, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To study the application of PCR technique in genetic detection of Duchenne/Becker muscular dystrophy (DMD/BMD). Methods A multiple PCR system is established according to the multiple sites of DMD/BMD exon deletion. Under different PCR conditions, multiple exon deletions, single-strand conformation polymorphism, allopolyploid, chain labeling, restriction fragment length polymorphism and microsatellite phenomenon were examined in 23 DMD/BMD patients and 57 suspected carriers of these genes. Results Fourteen of the 23 DMD/BMD patients were identified as having gene deletion, with another 2 carried gene duplicates. Forty female relatives of these 23 DMD/BMD patients were diagnosed as carriers of the genes. Conclusion This PCR system can be applied in detecting gene mutation of DMD/BMD, screening the carriers and in appropriate genealogical analysis of the patients with DMD/BMD.

Key words: muscular dystrophy; molecular biology; gene diagnosis; polymerase chain reaction

假肥大型肌营养不良 (Duchenne/Becker muscular dystrophy, DMD/BMD) 是营养不良性基因突变引起的 X-连锁性疾病 由于其基因庞大 结构复杂 种系镶嵌现象 新突变 3% 基因重组率 0% 高于正常水平 故对其基因诊断造成了极大的障碍 且 DMD/BMD 谱系构成和关键病例很难获得 故不易建立一套固定的基因诊断方法 本文介绍 PCR 技术检测 DMD/BMD 病例及其携带者的基因诊断方法

1 研究对象

先证者为来自我院门诊或住院诊治过的 23 例 DMD/BMD 患者 遥根据先证者临床表现 尧遗传学分析 尧家族史 尧疾病发展过程 尧血清肌酸激酶的活性 尧心电图和肌肉活检肌营养不良蛋白测定等已初步诊断为 DMD/BMD 对先证者的姐妹 尧姨母 尧姑母 尧表姐 尧侄女或外甥女共 57 人应用 PCR 技术进行 DNA 检测 23 例对照均为非神经疾病患者 遥

2 材料和方法

2.1 试剂和引物

寡核苷酸引物制备院 8 对引物参照 Chamberlain 和 Beggs 等^[1]提供的序列由美国 CyberSyn 公司合成 冤寡核苷酸纯化柱 冤PC 冤纯化 遥将 400 滋分装的引物沉淀于氢氧化胺中 冤加 3mol/L 醋酸钠 13 滋和无水乙醇 1 滋 遥-70 益冷冻 1 h 冤离心 15min 冤再加 200 滋蒸馏水 冤 D₂₆₀ 冤计算浓度, 配成 10 冤贮备液 遥

多重缺失筛选 PCR 终反应浓度院 渊mol/L 冤 Tris 67 (pH 8.3) 冤 NH₄冤SO₄ 16.6 冤 MgCl₂ 3.7 冤 SA 85 滋/ml 冤每个引物 0.25 滋 冤 NTPs 3mmol/L 冤基因组 DNA 20~50ng 冤每 10 滋含 TaqDNA 聚合酶 I 1U 遥

单链构象多态性 SCP 冤异源双链分析 PCR 终反应浓度院 渊mol/L 冤 Tris 67 (pH 8.3) 冤 NH₄冤SO₄ 16.6 冤 MgCl₂ 3.7 冤 SA 85 滋/ml 冤每个引物 0.5 滋 冤 NTPs 3 mmol/L 冤基因组 DNA 20~50ng 冤每 10 滋含 TaqDNA 聚合酶 0.3U 遥

连锁标记 PCR 终反应浓度院 渊mol/L 冤 Tris 67 (pH 8.3) 冤 NH₄冤SO₄ 16.6 冤 MgCl₂ 3.7 冤 SA 85 滋/ml 冤每个引物 0.5 滋 冤 NTPs 3mmol/L 冤基因组 DNA 20~50ng 冤

收稿日期 院 001-12-08

作者简介 院 刘咏梅 渊 62 冤 女 袁吉林长春人 袁 001 年毕业于第一军医大学 袁现在海口市第一八七医院儿科 尧副主任医师 尧电话 院 898-66891523

每 10 滋含 TaqDNA 聚合酶 0.3U 遥

2.2 方法

2.2.1 多重缺失的筛选 除 DNA 外袁将上述缓冲系统混合分装袁加入 2 滋 DNA 液渊0~25ng/ 滋冤女性样品作为阳性对照袁男性外显子缺失的样品作为阴性对照遥将 18 对引物分成两组渊第 1 组渊外显子 4尧尧2袁 17尧9尧4尧5尧8尧1曰第 2 组渊启动子袁外显子 3尧尧13尧3尧7尧0尧2尧0袁袁分两步对全组患者进行多重 PCR 扩增遥在 94 益的 PCR 板上滴 1 滴石蜡油袁PCR 扩增条件为 94 益初变性 3min袁0 次循环/min袁0 益 1 min袁2 益 2尧尧尧 和 5 min 渊每 10 次循环延长 1 min冤冤再加 2.5 滋伊BE 加样缓冲液遥将 6 滋 PCR 扩增产物加样在 2% 琼脂糖凝胶中袁在 0.5mg/ml 溴化乙锭和 TBE 电泳缓冲液中电泳 1 h 遥紫外灯下观察结果并拍照遥

2.2.2 单链构象多态性 渊SCP冤异源双链分析 PCR 液含 10伊PCR 缓冲液和寡核苷酸袁其他同多重 PCR 体系袁不含 DNA 遥选定 3 尧 个位点的外显子分析袁外显子 4尧7尧9尧 或 48尧1尧尧3 或 45尧0尧3尧7 或 12尧0尧2 或 44尧尧2 遥不能共存的外显子为渊5尧8冤渊7尧9冤渊5尧9冤渊5尧9冤和渊4尧0冤冤遥加 2 滋 DNA 样品渊0~25ng/ 滋冤女性样品作为阳性对照袁已知外显子缺失样品作为阴性对照遥在已预热 94 益 PCR 板上滴 1 滴石蜡油遥扩增条件为 94 益初变性 3min袁0 次循环/min袁0 益 1min袁2 益 1min袁合成 5min 遥95 益变性 5min 袁室温冷却袁则产生了异源双链遥再向 PCR 反应物中加入 15 滋蒸馏水尧5 滋甲酰胺上样缓冲液遥将 2 滋 PCR 产物渊异源双链 DNA冤上样 8% 聚丙烯酰胺凝胶上遥剩余样品 95 益变性 5min 袁水上迅速冷却遥将 6 滋上述 PCR 产物渊单链 DNA冤加入与双链 DNA 相同孔内遥4 益电泳袁电流 < 20mA 遥电泳后袁银染观察遥

2.2.3 连锁标记分析 将配制的不含 DNA 主液分装袁加 2 滋 DNA 液渊0~25ng/ 滋冤袁在已预热 94 益 PCR 板上滴 1 滴石蜡油遥扩增条件为 94 益初变性 3min 袁2 益温育 5min 遥

2.2.4 限制性片段长度多态性 渊FLP冤分析 加 1.5 滋 Bgt 域内切酶缓冲液 渊渊自 GiBco/rol 袁识别位点 A/GATCT 冤冤加 2.5 滋蒸馏水和 1 滋(5~10U) Bgt 域内切酶 渊浴 4~16h 冤加 4 滋伊BE 加样缓冲液遥将 10 滋样品上样于含溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上遥如产物 >500bp 袁则用 1% 琼脂糖 遥电泳后 袁溶解片段并进行分离尧拍照遥

2.2.5 微卫星分析 加 1.5 滋 Bgt 域内切酶缓冲液渊0伊尧 2.5 滋蒸馏水和 1 滋(5~10U) Bgt 域内切酶消化 PCR 产物渊此体系能分离相差 2~200bp 的 PCR 产物冤遥室

温浸泡 4~16h 遥如果 PCR 产物 >120bp 袁在电泳前应该用酚/ 氯仿抽提样品以除去蛋白质袁既加等量酚/ 氯仿于 PCR 样品中 袁离心 1min 遥取 4 滋 PCR 产物袁加 1 滋 5伊蔗糖上样缓冲液 遥聚丙烯酰胺 渊渊9%冤冤 0 mA 电泳 90~180min 后 渊一般 <100bp 的产物用 10% 的凝胶袁00~160bp 的产物用 8% 的凝胶袁60~200bp 的产物用 6% 的凝胶冤 袁银染观察遥

3 结果

对 23 例 DMD/BMD 先证者进行多重缺失筛选和微卫星分析袁有 14 例存在基因缺失袁其中外显子 1~19 区域缺失有 5 例袁外显子 44~52 区域缺失有 8 例袁基因中心外显子 20~42 区域缺失有 1 例遥基因重复 2 例遥其余 7 例先证者未见缺失袁说明患者可能为非缺失型或缺失发生在所用引物检测位点之外遥

对 14 个缺失型家系中的 29 名女性可疑携带者进行 SSCP/ 异源双链分析袁对 9 名非缺失型家系中的 28 名女性可疑携带者进行连锁分析和 RFLPs 分析袁结果为 17 名先证者之母亲尧 名姨母尧 名外祖母尧 1 名姐妹为杂合型遥

4 讨论

4.1 突变检测

大约 2/3 DMD/BMD 患者有营养不良性基因的 1 个或多个外显子缺失袁比缺失大都集中在 45~52 和 3~19 两个野热点/ 遥用多重 PCR 可检测到 25 个外显子袁约占 98% 的缺失 袁要想检测到更多的缺失 袁必须用 cDNA 探针分析 遥5%~10% 患者存在重复序列袁以往用 cDNA 探针 Southern 斑点杂交技术的剂量估计可检测到重复序列 曰用脉冲场凝胶电泳 渊FGE冤 或 RNA 分析可确定重复序列的数量 袁检出率也较高 袁但此方法操作难度大 袁对实验条件要求高 曰目前自动荧光定量 PCR 分析将是检测重复序列的最理想方法 遥用 RT-PCR 方法对末梢血淋巴细胞基因非法转录分析 袁再通过蛋白断裂试验 袁可系统地识别出突变性质 袁但这种方法只适用于科研 遥用 SSCP 或异源双链分析对 25 个外显子进行检测 袁可用于某些点突变和多重缺失的筛选 渊渊但这套体系需要一系列引物 袁否则很难显示出突变的集中位点 遥

4.2 携带者的直接检测

在一个家系中发现有基因缺失 袁就可用直接试验检测携带者 遥最简单方法是分析缺失区域的多态性 袁对于一位女性来说 袁她对特定标记表现为杂合子 袁就可排除携带者 渊渊除非种系镶嵌现象 冤冤 遥如果是携带者 袁她就未遗传母系的这种特定标记的等位基因 遥此方法快速并有效 袁但由于缺少标记物而受到限制 遥携

带者的直接检测方法还有荧光原位杂交技术 FISH 即用已知的粘粒探针杂交细胞分裂中期染色体携带者显示出一条 X- 染色体非携带者显示两条 X- 染色体 为避免假阴性而需要分析至少 10 个细胞 此方法结果肯定 通常用于交界学科或细胞遗传学试验中 其他直接方法包括 PFGE 或异位营养不良性基因转录的 RT-PCR 分析 PFGE 对缺失携带者有效 也可检测重复序列 但它需要对技术积极扶持 异位营养不良性基因 RNA 转录的 RT-PCR 分析 外周血淋巴细胞用于携带者的筛选 是很有发展前景的有效方法 但技术上难度大 荧光定量 PCR 用于筛选多重缺失 将是一种新的缺失检测方法 CR 扩增需确保在对数阶段 分析每个外显子荧光强弱 对比所测得的峰和统计学上的峰域 携带者缺失的外显子大约是非携带者的二分之一

在一个家系中发现有点突变 应特异设计分析系统检测携带者 如果突变改变了限制酶切位点 设计一个被修饰的寡核苷酸引物 以产生一个新的限制位点 这个新位点即包括正常的核酸序列 包括突变的核酸序列 或者包括两者之一

种系镶嵌现象用直接检测方法对体细胞进行检测 结果表明 虽然患儿母亲不是携带者 但她仍有 5% 的可能性使其他孩子发病 由此得出 患儿的母亲将不能被排除为携带者 如果一位女性肯定是携带者 她的患儿就可能遗传了祖父母或外祖父母的部分或全部特征性基因的单基因型 此外祖父有可能是镶嵌体 这种情况下 对这个患儿母系的姨妈会有牵连 对祖父母和外祖父母的镶嵌现象的病例已得到证实 但其发生频率没有确切的数据

4.3 携带者的间接检测

在一个家系中如果没发现突变或其他信息 可用

连锁分析间接检测方法对携带者筛选或产前诊断 在营养不良性基因内含子中 多态性有 20 多种 这些多态性是在 2 个等位基因 RFLPs 到 高多态性的微卫星标志之间变化 这些多态性可引起整个家系患病 这时只能用高水平内含子基因重组和高频率新突变来解释 营养不良性基因第 3 位和第 44 位内含子为两个重组热点 在进行连锁分析时 理论上应在 5' 末端和第 3 4 内含子之间标记 3 个位点 可使重组检出率提高两倍 连锁分析应与家谱和肌酸激酶水平结合起来考虑 肌酸激酶水平与携带者的危险性呈正相关

参考文献

刘咏梅, 封志纯, 方振伟. 假肥大型肌营养不良的分子生物学和基因诊断 第一军医大学学报, 2001, 21 增刊 58-60.

Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier HE, et al. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy New York: Academic Press, 1990. 272-81.

Beggs AH, Koenig M, Frederick M, et al. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction Hum Genet, 1990, 86(1): 45-8.

Liu Y, Liu H, Xie B. Detection of gene deletions in Chinese patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy using cDNA probes and the polymerase chain reaction method Life Science, 1999, 65 (9), 8648-69.

Lisiecka D, Wigowska-Sowinska J, Kwiatkowska J, et al. Molecular-genetic characteristics of mutations in dystrophin gene and clinical symptoms in Duchenne muscular dystrophy Neurol Neurochir Pol, 1998, 32(5): 1069-79.

Yau SC, Bobrow M, Mathew CG, et al. Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis Med Genet, 1996, 33 (4): 550-8.

Prior TW. Perspectives and molecular diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies Clin Lab Med, 1995, 15(4): 927-41.

连接 730 页冤

胞性白血病 第一军医大学学报, 1997, 17(1): 10-1.

Xu B, Zhou SY, Liu QF, et al. Treatment of chronic myeloid leukemia in elderly patients with HA chemotherapy protocol in rather individualized and discriminative way J First Mil Med Univ, 1997, 17(1): 10-1.

Kantarjian HM, Giles FJ, O'Brien SM, et al. Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and

chemotherapy Hematol Oncol Clin North Am, 1998, 12(1): 31-5.

Hasford J, Pfirmann M, Hehlmann R, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alpha Natl Cancer Inst, 1998, 90(11): 850-8.

杜庆锋, 刘晓力, 周淑芸. 干扰素- α 治疗慢性粒细胞白血病的现状与进展 国外医学输血与血液学分册, 2000, 2: 91-2.

瞿群华, 熊金元, 张新华. 三尖杉酯碱和阿糖胞苷方案治疗慢性粒细胞白血病 18 例 中华内科杂志, 1994, 33(5): 305.

应用超选择动脉灌注化疗治疗残胃复发癌

何建苗 袁永东 袁志宇 袁志东 渊解放军 309 医院普外科袁北京 100091 冤

摘要 目的 评价超选择靶区动脉置泵灌注化疗治疗晚期残胃复发癌的疗效遥方法 对我院术中证实不能手术切除的 18 例残胃复发癌袁术中超选择靶区动脉置泵袁术后灌注化疗的疗效进行分析遥结果 化疗后袁临床症状均有不同程度的改善遥肿瘤病灶完全缓解 1 例袁部分缓解 13 例袁稳定 2 例袁恶化 2 例袁有效率为 77.8%遥肿瘤细胞病理学改变有效率为 83.3%遥 0.5 尧 1.0 尧 1.5 尧 2.0 年生存率分别为 94.4% 尧 66.7% 尧 50.0% 和 27.8%遥结论 超选择动脉灌注化疗是治疗晚期残胃复发癌的有效方法袁可以明显延长患者的带癌生存期遥

关键词 残胃复发癌 肿瘤病灶 动脉灌注 化疗

中图分类号 院 453.9;R735.2 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588/2002/22-0734-02

Superselective intra-arterial infusion chemotherapy for recurrent cancer in the remnant stomach after partial gastrectomy

HE Jian-miao, PU Yong-dong, CAO Zhi-yu, ZHU Zhi-dong

Department of General Surgery, 309 Hospital of PLA, Beijing 100091, China

Abstract: Objective To investigate the effect of superselective intra-arterial infusion chemotherapy in the treatment of advanced recurrent cancer in the remnant stomach after previous partial gastrectomy. Methods Eighteen patients with advanced recurrent cancer in the remnant stomach that were non-resectable as confirmed in the operations were included in this study, who subsequently received superselective intra-arterial infusion chemotherapy. Results Improvement of the symptoms to various degrees were achieved in all patients after the therapy, with the total rate of tumor reduction of 77.8% and pathologically confirmed improvement rate of 83.3%. The 0.5-, 1.0-, 1.5- and 2.0-years survival rates were 94.4%, 66.7%, 50.0% and 27.8% respectively. Conclusion Superselective catheterization is effective in treatment of advanced recurrent cancer in the remnant stomach, which can significantly prolong the tumor-bearing survival period of the patients.

Key words: advanced recurrent cancer, remnant stomach; tumor focus; arterial infusion; chemotherapy

有关残胃复发癌的定义目前说法较多,本文所指的残胃复发癌系指因胃癌根治术后残胃再度出现癌灶,包括胃的局部复发癌和残胃内新生癌。残胃复发癌由于早期诊断困难,局部解剖结构变异大和癌灶周围粘连严重,使再次手术切除率低,且预后也较差。临床医生对复发癌多采取消极的态度。区域性动脉灌注化疗以其局部药物浓度高,全身毒副作用小,而被广泛应用于肿瘤的治疗。我院自 1994 年 1 月至 2000 年 10 月应用超选择动脉灌注化疗治疗残胃复发癌 18 例,效果较好,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组病例共 18 例,其中男性 12 例,女性 6 例,年龄 38~79 岁,平均年龄 54.6 岁。确诊为残胃复发癌距首次手术时间为 8~132 个月,平均 38 个月。首次手术均为根治性切除术,其中采用 Billroth-Ⅱ 吻合 5 例, Billroth-Ⅰ 吻合 12 例,结肠后吻合 1 例。

复发后临床上有上腹痛者 13 例,体重减轻者 14 例,有梗阻症状者 10 例,上腹部可触及包块者 8 例,有消化道出血者 9 例,有癌性腹水者 11 例。本组病例手术前,均进行 B 超、钡餐、胃镜及 CT 检查,并监测癌胚抗原 (CEA) 变化。病理分型:腺癌 6 例,粘液腺癌 2 例,低分化腺癌 10 例。8 例中合并肝转移的有 6 例。术前癌胚抗原 (CEA) 阳性率 72.2% (13/18),灌注化疗后癌胚抗原 (CEA) 阳性率为 27.8% (5/18)。

1.2 置泵方法

选择上腹部正中切口,剖腹探查残胃复发癌,已无手术切除机会,决定行化疗泵植入术。根据肿瘤部位及周围情况选择癌肿的主要供血动脉置泵。由于局部解剖结构变异大,周围粘连重,解剖血管往往较困难,我们多采用胃短动脉、胃左动脉分支及腹腔干动脉。合并有肝转移者,解剖肝十二指肠韧带,入胃十二指肠动脉内,插入到肝动脉。每例患者进行术中美蓝显影,待肿瘤部位显影满意后,予以固定导管,将化疗泵泵体埋置于主切口旁皮下。本组术中置化疗泵 1 个 9 例, 2 个 7 例, 3 个 2 例。化疗泵选用具有防逆流功能的动脉泵,德国贝朗公司生产的 PFM 型产品,并将肿瘤周围的营养血管逐一结扎,使肿瘤缺血。对已

收稿日期 院 002-01-09

作者简介 院 何建苗,男,1964 年,浙江诸暨人,1987 年毕业于第一军医大学军医系,外科副主任医师,电话 院 10-66775141

出现梗阻症状或将出现梗阻症状的患者行胃空肠吻合或空肠造瘘手术遥所有患者关腹前均用含 1.0g 氟脲嘧啶渊-Fu冤的温热低渗蒸馏水渊3 益左右冤浸泡化疗 10~15min遥

1.3 化疗方法

术后 7~10d 开始动脉内灌注化疗药物遥化疗方案渊甲酰四氢叶酸钙 100mg 静脉滴注渊灌注前 30min 曰 5-Fu 1.0g 袁丝裂霉素 渊IMC冤 6~10mg 袁表阿霉素 渊PI冤 0mg 或羟基喜树碱 渊PT冤 0mg 交替使用遥化疗药物经生理盐水稀释后用微量泵缓慢注入袁时间 120~240min 遥每周 1 次袁~3 次为一个疗程袁休息 1 个月后进行下一疗程遥化疗同时辅以沙培林 5 g 泵内注射袁 5 次为一个疗程遥化疗期间注意监测血象渊肾功能 和 CEA 的变化遥化疗间歇期中间泵内注射肝素盐水稀释液袁防导管血栓形成遥

2 结果

2.1 生活质量的改变

全组病例经动脉灌注化疗后袁食欲增加者 13 例袁 体重增加者 12 例袁腹痛减轻或消失者 11 例袁梗阻 症状消失或减轻者 7 例袁腹水减少或消失者 6 例遥

2.2 肿瘤大小变化

化疗 3 个疗程后均进行野遥超尧钡餐尧T 检查袁参照 WHO 疗效评定标准袁肿瘤病灶完全缓解 1 例袁 部分缓解 13 例尧稳定 2 例尧恶化 2 例遥有效率渊包括完 全和部分缓解冤为 77.8%遥

2.3 组织学改变

化疗 3 个疗程后袁患者做胃镜检查袁并取活检行 病理学分析遥结果癌细胞全部坏死尧消失袁以纤维组织 代替者 2 例袁占 11.1%遥80% 以上的癌细胞出现核变 性尧固缩尧碎裂尧坏死袁细胞间质有炎性细胞浸润袁纤维 组织增生者 10 例袁占 55.6%遥60% 以上癌细胞出现变 性尧固缩尧坏死袁细胞间质有空泡尧炎性细胞浸润者 3 例袁占 16.7%遥细胞无明显变化者 3 例袁占 16.7%袁有 效率达 83.3%遥

2.4 毒副反应及并发症

大多数患者有程度不等的恶心尧呕吐尧骨髓抑制 等毒副反应袁但较全身静脉化疗轻袁停药后多能自行 消失遥化疗过程中有 2 例出现一过性上腹痛袁泵内 注射 0.25% 普鲁卡因 5~10ml 后可缓解袁并能继续完 成化疗遥2 例灌注化疗 4 次后出现导管堵塞袁经肝素 稀释液冲洗后不能复通遥1 例出现泵周皮下积液袁穿 刺抽除后痊愈遥因化疗和胃周血管离断而引起胃壁 坏死及穿孔遥

2.5 随访及生存率

本组 18 例均获得随访遥随访 8~38 个月遥结果生

存时间明显延长遥其中生存满 6 个月者占 94.4% (17/18)袁满 12 个月者占 66.7%渊2/18)袁满 18 个月者 占 50%渊1/18)袁袁年以上占 27.8%渊1/18)遥

3 讨论

对于残胃复发癌的治疗原则是以手术治疗为主 的综合治疗遥但由于诊断方法的局限性袁早期诊断困 难袁再加上局部解剖结构的变异和周围的严重粘连袁 因而残胃复发癌手术切除率低遥临床医生往往对残胃 复发癌采取消极的态度遥我们采用术中超选择动脉置 泵袁术后定期灌注化疗药物和免疫制剂治疗遥结果显 示袁明显改善了患者的生活质量袁提高了化疗有效率袁 延长了患者的生存期遥

术中超选择性肿瘤靶区血管置泵袁是建立体表直 达肿瘤区域的野高速公路冶遥术后长时间尧高浓度尧反复 多次从皮下泵灌注化疗药物和免疫制剂袁使癌组织和 癌旁淋巴组织药物浓度为全身化疗时的 19 和 23 倍袁门静脉血中药物浓度为全身化疗的 4~200 倍袁 而且有效作用时间延长遥而化疗药物对癌细胞的杀伤 作用在一定范围内是呈浓度和时间依赖性的遥即局部 药物浓度增加 1 倍袁杀伤癌细胞的数量可增加 10 倍遥 药物作用时间延长袁杀灭癌细胞的效果越明显遥另 外袁肿瘤患者免疫机能抑制明显袁局部灌注生物制剂 沙培林袁明显增加机体的免疫功能和化疗药物的抗 肿瘤效果遥且术中皮下置泵袁术后定期反复冲击化疗袁 使癌细胞来不及产生耐药性遥

动脉区域灌注化疗袁抗癌药物进入癌肿后袁经门 静脉系统及淋巴系统回流袁可在门静脉尧肝脏及癌肿 淋巴回流区域形成高浓度的抗癌野浴场冶袁有助于治疗 或抑制肝脏和淋巴结的转移遥而且区域性动脉灌注化 疗给药袁由于药物范围的局限及肝脏的代谢解毒袁使 到达外周循环的药物浓度低袁出现晚且很快消失袁对 全身毒副作用小袁使局部大剂量化疗成为可能遥本组 患者经随访观察袁5尧6尧7尧8 年生存率分别为 94.4%尧6.7%尧7.8%遥

准确选择靶区血管是决定区域化疗疗效的关键遥事实上袁残胃复发癌由于病程较晚袁局部解剖结 构变异大袁周围浸润粘连严重袁术中血管解剖袁超选择 置泵操作技术要求很高遥术中可借助美蓝显影定位袁 直至肿瘤区域染色满意后固定导管遥但由于本组病例数 较少袁观察时间不长袁其远期疗效有待于进一步观察遥

参考文献

啗暂 陈峻青, 张文范, 陈则行, 等. 残胃再复发癌的诊 断与治疗. 中华肿瘤杂志, 1984, 6(渊冤)300-3.

Chen JQ, Zhang WF, Chen ZX. Diagnosis and surgical treatment of

编码霍乱肠毒素 B 亚单位基因植物表达载体的构建

彭志强¹, 俞守义¹, 袁迪求², 贺竹梅² 渊第一军医大学流行病学教研室 袁广东 广州 510515 曰中山大学生物工程研究中心 袁广东 广州 510275 冤

摘要 目的 构建含霍乱肠毒素 B 亚单位 CTB 基因的植物双元表达载体 遥方法 采用高保真 PCR 方法调出 CTB 基因袁定向克隆到中间载体 pRTL2 袁经测序证实核酸序列正确后袁再亚克隆到含植物双元表达载体 pBI121 上 曰采用电击法袁将含 CTB 的植物表达载体转入根癌农杆菌中袁并进行酶切证实 遥结果 PCR 扩增的 CTB 片断亚克隆到中间载体袁得到 pRCTB 和 pRCTBK 袁测序证实 CTB 核酸序列正确 曰再与根癌农杆菌双元载体 pBI121 连接袁获得含 CTB 基因的植物双元表达载体 pBI-CTB 和 pBI-CTBK 袁转入根癌农杆菌的载体 袁酶切证实正确 遥结论 采用正确技术路线袁构建了含 CTB 基因的植物表达载体 袁为下一步的转基因植物表达研究打下了坚实的基础 遥

关键词 霍乱肠毒素 B 亚克隆 曰聚合酶链式反应 曰植物表达载体

中图分类号 袁516.5 曰Q782 文献标识码 袁 文章编号 袁000-2588 渊002 冤8-0736-03

Construction of plant expression vectors containing the gene encoding cholera toxin B subunit PENGZhi-qiang¹, YUShou-yi¹, YUDi-qiu², HEZhu-mei²

¹Department of Epidemiology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Biotechnological Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

Abstract: Objective To construct the plant expression vector containing the nucleotide sequence encoding cholera toxin B (CTB) subunits. Method Using high-fidelity PCR, we amplified CTB genes that were then subcloned into the transition vector pRTL2. Following confirmation of the CTB nucleotide sequence, the vector was subcloned into the plant vector pBI121 that was subsequently transferred into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by electroporation. Results CTB DNA that was ligated into the transition vectors resulted in the 2 vectors designated as pRCTB and pRCTBK. After the 2 vectors were ligated into the plant binary vector pBI121 respectively, new plant binary vectors, namely pBI-CTB and pBI-CTBK, were reproduced. Analysis with restriction endonucleases confirmed successful transfer of pBI-CTB and pBI-CTBK into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Conclusion With appropriate technological strategy, the plant binary expression vectors encoding CTB have been constructed, which facilitates further investigation of CTB protein expressions in transgenic plant.

Key words: cholera toxin B subunits; subcloning; polymerase chain reaction; plant expression vector

霍乱肠毒素 B 亚单位 CTB 是霍乱毒素 CT 的免疫原部分 霍乱毒素及其 B 亚单位是迄今为止发现的最强的 能刺激机体粘膜反应的免疫原 遥目前 CTB 基因已在大肠杆菌和沙门氏菌中成功表达 遥为了利用植物作为 植物发生器 袁生产预防感染性腹泻的可食用疫苗 袁我们构建了含 CTB 基因植物表达载体 袁以后将 CTB 基因在植物细胞中表达的研究打下基础 遥

1 材料和方法

1.1 菌种及质粒

含 CTB 基因质粒 pMGL102 由军事医学科学院徐兵博士惠赠 袁大肠杆菌菌株 DH5 袁 pOp10 袁中间载体 pRTL2 和植物双元载体 pBI121 等质粒由中山大学生物工程研究中心保存 遥根癌农杆菌菌株 LBA4404 由华南农业大学刘耀光教授惠赠 遥

1.2 主要分子生物学试剂

DNA 限制性内切酶 BamH I 袁 Kpn I 袁 Hind III 袁 DNA 连接酶为 Promega 公司及德国 Boehringer Mannheim 公司产品 遥 RNase A 袁-gal 和抗生素氨苄青霉素 Amp 袁卡那霉素 Kan 袁链霉素 Str 为 Sigma 公司产品 遥其余试剂为国产分析纯 遥 PCR 试剂盒 渊 TaKaRa ExTaq 酶 冤 自大连宝生物工程公司 遥

1.3 PCR 引物

以 CTB 两端序列设计 3 条 PCR 引物 袁1 和 P2 扩增编码 CTB 基因序列 袁1 和 P3 扩增编码 CTB + SEKDEL 基因序列 袁1 物由中国科学院上海生物化学研究所合成 遥

P1: 5' CCCGGGTACCTTATGATTAATAAATTTGG3'

Kpn I

P2: 5' TACAGGATCCITTAATTTGCCATACTAATTG3'

BamH I

P3: 5' TACAGGATCCITTCATAGCTCATCTTTCTCAGATTAA

BamH I

SEKDEL

TTTGCCATACTAATTG3'

收稿日期 袁001-03-07

作者简介 彭志强 渊1962 冤男 袁湖南双峰人 袁2001 年毕业于第一军医大学 袁博士 袁电话 袁020-61648311

1.4 DNA 重组

质粒 DNA 酶切、酶切片段回收、连接、转化及重组体筛选参照文献 [1] 的方法进行。植物二元载体 DNA 导入根癌农杆菌参照文献 [2] 的方法进行。

2 结果

2.1 pRCTB 和 pRCTBK 的构建

采用 PCR 方法调出 CTB 基因。引物 P1 和 P2 扩增 CTB 基因。分别在 CTB 基因两端加上 KpnI 和 BamHI 两个酶切位点。引物 P1 和 P3 扩增 CTB 的 SEKDEL 信号肽。同样在其两端加上 KpnI 和 BamHI 两个酶切位点。PCR 扩增可得到 400bp 左右的产物。琼脂糖凝胶电泳回收 CTB 片段。用 BamHI 和 KpnI 双酶切。同样用 BamHI 和 KpnI 双酶切的 pRTL2 连接。转化大肠杆菌。经含抗生素 LB 平板筛选。提取质粒。酶切鉴定。得到 pRCTB 和 pRCTBK 克隆。测序证实 CTB 核苷酸序列与文献报道一致。

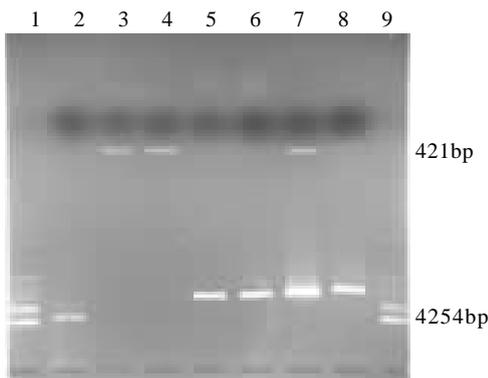


图 1 pRCTB 构建的酶切图谱鉴定

Fig.1 Identification of the construction of pRCTB by agarose gel electrophoresis

Lane 1 and 9: DNA markers (EcoT14); Lane 2: pBI121/HindIII; Lane 3: CTB PCR; Lane 4: CTB+SEKDEL(PCR); Lane 5: pRCTBK; Lane 6: pRCTB; Lane 7: pRCTBK/BamHI+KpnI; Lane 8: pRCTB/BamHI+KpnI

2.2 pBICTB 和 pBICTBK 的构建

用 HindIII 将 CTB 完整的基因表达盒 (含启动子、增强子和终止子) 从 pRCTB 和 pRCTBK 上切下。与同样用 HindIII 酶切的 pBI121 连接。转化大肠杆菌。得到 9 个菌落。提取质粒。酶切鉴定。表明 4 号和 1 号以及 2 号和 8 号为连接正确的转化子。分别构成 pBICTB 和 pBICTBK (图 2)。

2.3 植物表达载体导入根癌农杆菌

将构建的表达载体 pBI121-CTB 和 pBI121-CTBK 用电转移法转化根癌农杆菌株系 LBA4404。d 后长出菌落。由于根癌农杆菌的质粒拷贝数很低。因

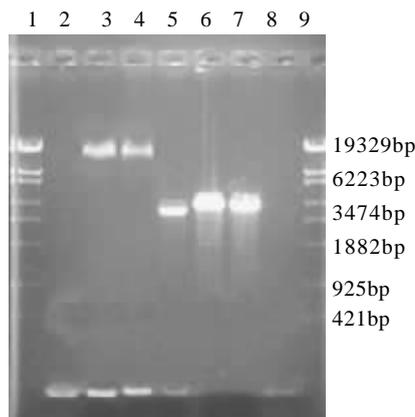


图 2 pBI-CTB 构建的酶切图谱鉴定

Fig.2 Identification of the construction of pBI-CTB by agarose gel electrophoresis

Lane 1 and 9: DNA markers (EcoT14); Lane 2: CTB(PCR); Lane 3 and 4: pBI-CTB and pBI-CTBK/KpnI+BamHI digestion; Lane 5: pRCTB/KpnI+BamHI digestion; Lane 6 and 7: pRCTB and pRCTBK/KpnI; Lane 8: CTB-K(PCR)

此先采用减法提取质粒。再转化大肠杆菌。扩增后用减法提取质粒。酶切鉴定。用 HindIII 酶切与 pBI121-CTB 和 pBI121-CTBK 的 HindIII 酶切图谱一致。用 BamHI 和 KpnI 双酶切均可切出 400bp 的条带。用 PCR 方法检测该农杆菌均可扩增到 CTB 片段。表明 2 种质粒均已分别导入根癌农杆菌中。因此转化到农杆菌中的二元表达载体含有 CTB 基因及其表达调控元件。是完整的 (图 3)。

3 讨论

中间载体 pRTL2 含有组成型启动子 (CaMV 35S) 和 2 个增强子以及多克隆酶切位点。供连接外源基因。MGL102 含有 CTB 基因 (长 394kb)。由于无合适的酶切位点。不可以将 CTB 基因直接切下。连接到中间载体上。因此采用高保真 PCR 方法调出 CTB 基因。并在引物 P1 和 P2 设计中。在扩增的 CTB 5' 端加上 KpnI。3' 端加上 BamHI 两个酶切位点。以便定向克隆到中间载体上。引物 P3 和 P2 基本相同。不同之处是在 CTB 的 3' 端和 BamHI 酶切位点之间加上内质网引导序列 SEKDEL。目的是以后比较不同植物表达载体 CTB 的表达量。

实现外源基因在植物中的表达。必须将外源基因连接到特定的植物表达载体上。通过根癌农杆菌对植物的侵染作用。将外源基因整合到植物染色体 DNA 上。中间载体 pRTL2 中的 CaMV35S 启动子是常用的植物表达启动子。含有一个双增强子序列。为组成型表达。在植物大部分组织中能很好地启动外源基因的表达。另外。在启动子上游有两段增强子。具有

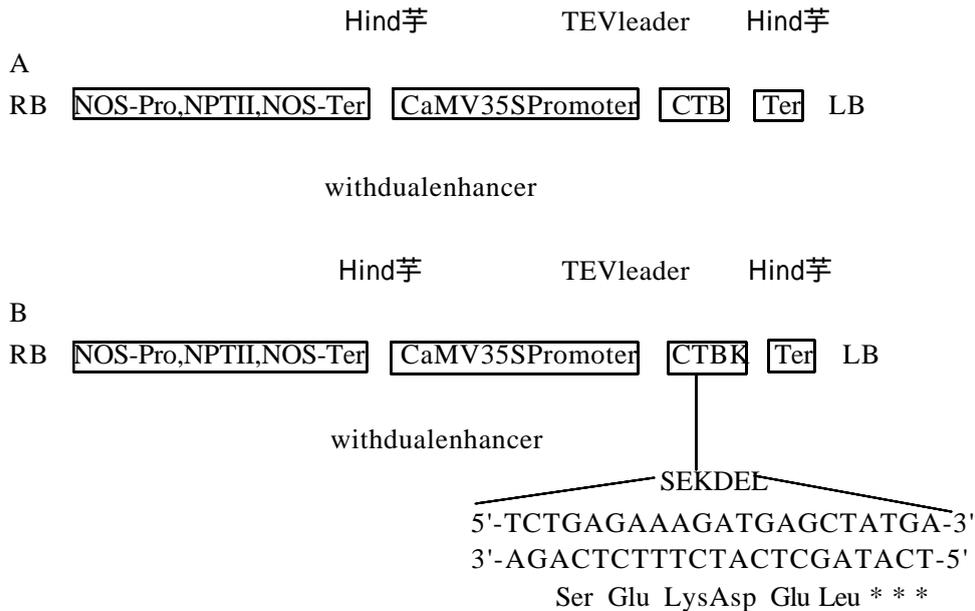


图 3 含 CB-B 基因的植物双元表达载体结构图谱
Fig.3 Construction map of cholera toxic B subunit gene and its plant expression vectors
A:pBI-CTB;B:pBI-CTBK

提高外源基因表达量的作用是在 pBI-CTBK 载体中 CTB 基因的 3' 端引入了 SEKDEL 序列。SEKDEL 是内质网引导序列，能将外源蛋白积累在植物细胞的内质网中，从而提高蛋白质的表达水平。根癌农杆菌仅将左右边界序列 LB 和 LB 之间的 DNA 序列整合到植物染色体中，因此整个含 CTB 基因的表达调控元件启动子、增强子、外源基因和终止子通过酶切连接构建在植物双元载体 pBI121 的左右边界序列之间。由于构建的 CTB 表达为独立的表达单元，因此不需要鉴别其方向。左右边界序列之间还包含一个 NPT 基因，也是一个独立的表达单元，其表达产物能够磷酸化卡那霉素及其衍生物，作为筛选转基因植株的抗性基因。

参考文献

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1-50.
Hofgen R, Wilmshuter L. Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. Nucleic Acids Res, 1988, 16(20): 9877-81.
Mason HS, Haq TA, Clements CJ. Edible vaccine protects mice against Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT). Vaccine, 1998, 16: 1336-43.
Tackaberry ES, Dudani AK, Prior F, et al. Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B in seeds of transgenic tobacco. Vaccine, 1999, 17: 3020-7.
Arntzen CJ. Pharmaceutical foodstuffs. Nature Med Vacc Suppl, 1998(4): 502-13.

责任编辑 杨金星

连接 735 页

recurrent cancer in the residual stomach. Chin J Oncol, 1984, 6(4): 300-3.
刘 强, 王舒宜. 复发胃癌及残胃癌的外科治疗. 中国实用外科杂志, 1998, 18(8): 494-5.
朱志东, 蒲永东. 氟脲嘧啶经胃左动脉及外周静脉化疗的药代动力学比较. 中国胃肠外科杂志, 2000, 3(1): 28-30.
Zhu ZD, Pu YD. The comparison of 5-Fu pharmacokinetics after left

gastric artery intraarterial infusion and by peripheral intravenous administration in treatment for gastric carcinoma. Chin J Gastrointestinal Surg, 2000, 3(1): 28-30.
詹晓星. 介入放射学中药代动力学研究. 国外医学临床放射学分册, 1989, 12(6): 327-9.
何建苗, 蒲永东. 超选择动脉灌注化疗加胃周血管离断术对晚期胃癌的治疗效果. 中华外科杂志, 2001, 39(3): 252.

MRI在颅内生殖细胞瘤诊断中的作用

邱士军 袁雪林 袁仁民 渊第一军医大学南方医院影像中心 袁广东 广州 510515 冤

摘要 目的 探讨 MRI 对颅内生殖细胞瘤的诊断价值遥方法 对 19 例经手术和病理证实的颅内生殖细胞瘤患者的 MR 表现进行分析遥结果 19 例中袁 0 例位于鞍区袁 袁 中男性 5 例袁 女性 5 例袁 田 例位于松果体区袁 例位于丘脑基底节区袁 袁 男性遥其 MR 表现为渊冤WI 等或稍低信号袁 袁 WI 等或稍高信号袁 袁 鞍区和松果体区肿瘤无水肿袁 丘脑基底节区肿瘤轻至中度水肿和占位效应渊冤Gd-DTPA 增强扫描肿瘤呈不均匀或均匀明显强化遥结论 MRI 的多轴位成像及 Gd-DTPA 应用有助于颅内生殖细胞瘤的诊断与鉴别诊断遥病人性别袁 发病年龄和肿瘤部位袁 大小袁 形态及信号强度具有一定特点袁 袁 多数情况下是可以做出术前诊断的遥

关键词 生殖细胞瘤 磁共振成像 松果体瘤

中图分类号 院 739.41 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588 渊 2002 冤 08-0739-03

Role of magnetic resonance imaging in the diagnosis of intracranial germinoma

QIU Shi-jun, ZHANG Xue-lin, CHANG Ren-min

Center of Imaging Diagnosis, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the value of magnetic resonance imaging (MRI) in the diagnosis of intracranial germinoma. Methods A retrospective analysis of the MRI features was conducted in 19 cases of pathologically confirmed intracranial germinoma. Results The lesion was located in the sellar region in 10 cases, in the pineal region in 6 and in the thalamus and basal ganglia in 3. The characteristic MRI of intracranial germinoma included the following features: (1) In T₁-weighted images (T₁WI), the lesions were isointense or slightly hypointense, which appeared disointense or slightly hyperintense in T₂-weighted images (T₂WI). The germinoma in the sellar region and pineal regions showed no edema, but those in the thalamus and basal ganglia showed minimal or moderate edema with space-occupying effect. (2) Homogeneous or inhomogeneous Gd-DTPA enhancement was observed in most of the tumors. Conclusion Multiplanar imaging and Gd-DTPA enhancement in MRI are helpful in the diagnosis and differential diagnosis of intracranial germinoma, which presents features characteristic of the gender and age of the patients with the disease, location, size, form and image intensity of the lesion, and therefore, preoperative MRI diagnosis of the tumor can be possible.

Key words: germinoma; magnetic resonance imaging; pinealoma

颅内生殖细胞瘤是一种少见的肿瘤袁 占颅内肿瘤的 1% 以下遥 好发于儿童和青少年袁 幼儿和老年人罕见遥 主要发生在松果体区及鞍区袁 发生于丘脑基底节区较少遥 本文回顾性分析我院 19 例 MR 扫描并经手术病理证实的颅内生殖细胞瘤患者袁 报告如下遥

1 材料与方 法

1.1 研究对象

19 例中袁 男 14 例袁 女 5 例遥 年龄 6~39 岁袁 平均 18.2 岁遥

1.2 MRI 检查

MRI 检查采用 Siemens 公司 Vision Plus 1.5T 高场超导型磁共振扫描仪袁 E 序列及 FSE 脉冲序列袁 均行 T₁WI 和 T₂WI 扫描袁 常规矢状尧 轴位扫描袁 全部病例均做了 Gd-DTPA 增强扫描袁 静脉注射对比剂 Gd-DTPA 0.2ml/kg b.w. 遥 成像参数 T₁ 加权像为 院 R

(重复时间) = 552ms, TE 渊 回波时间 冤 = 12ms, T₂ 加权像为 院 R = 5 000ms, TE = 128ms 袁 层厚 5~8mm 袁 层间距 0.2mm 袁 矩阵 184伊 256 遥

2 结果

2.1 病变部位

具体见表 1 遥

表 1 颅内生殖细胞瘤分布统计表

Tab.1 Distribution of intracranial germinoma

Region(cases)	Gender		Age(years)			Size (cm)		
	Male	Female	Min.	Max.	Average	Min.	Max.	Average
Sellar(10)	5	5	6	39	16.9	2.5	5.0	3.41
Pineal(6)	6	0	12	29	20	1.1	5.1	2.74
Thalamus and basal ganglia (3冤)	3	0	10	34	22	3.6	5.8	4.88

2.2 主要临床表现

鞍区肿瘤以视觉障碍最多见渊 10 冤袁 表现为失明或视力下降尧 眼球活动受限等遥 其次为尿崩症渊 10 冤及颅内压升高表现渊 10 冤袁 后者表现为头痛尧 恶心尧 呕

收稿日期 院 002-02-24

作者简介 院 邱士军 渊 1964- 冤 男 袁 袁 山东齐河人 袁 1998 年毕业于第一军医大学袁 士 袁 主治医师 袁 讲师 袁 电话 院 20-61642086 袁 e-mail: qsj@fimmu.edu.cn

吐等遥松果体区肿瘤以颅内压升高症状为主渊6冤注
 主要是由于松果体区肿瘤阻塞中脑导水管所致袁其次为
 视觉障碍渊6冤遥丘脑基底节区 3 例有 2 例出现颅内压
 升高袁 1 例出现偏瘫尧偏盲和偏身感觉障碍的三偏症状遥
 2.3 MR 表现

鞍区 10 例袁 例位于三脑室前下部袁形态多样袁
 均为不规则性袁边界清楚遥T₁WI 有 3 例与灰质信号相
 似袁 例略低于灰质袁其余 3 例低于灰尧白质遥T₂WI 有
 1 例与灰质信号相似袁其余 9 例均表现为高信号遥增
 强扫描明显均匀强化有 8 例袁不均匀中等强化有 2 例
 其内可见小点状囊变区遥所有病例均未见明确出血及
 瘤周水肿渊图 1 冤渊术前有 1 例因肿瘤囊变区较大而误
 诊为颅咽管瘤遥

松果体区 6 例袁肿瘤形态为不规则形袁呈分叶状遥
 其中 3 例边缘光滑袁T₁WI 肿瘤为等或略低信号袁T₂WI
 为高信号遥增强扫描 5 例明显均匀强化袁 例呈不均
 匀性强化遥有 3 例可见小灶性坏死囊变区遥所有病例
 均未见出血及瘤周水肿渊6 例均有脑干积水和中脑导
 水管受压征袁 例鞍区同时发生肿瘤袁 例有双侧室管
 膜下种植转移 渊图 2 冤袁 例合并有蜘蛛网膜下腔种植
 转移遥

丘脑基底节区 3 例袁 例起源于左侧袁 例起源于
 右侧遥T₁WI 肿瘤为低信号袁轻度混杂信号袁T₂WI 肿瘤
 为非均匀性高信号袁边缘模糊 袁瘤周见轻度狭窄水肿
 区 2 例袁中度水肿区 1 例遥增强扫描均表现为不均匀
 性斑片状强化渊图 3 冤遥

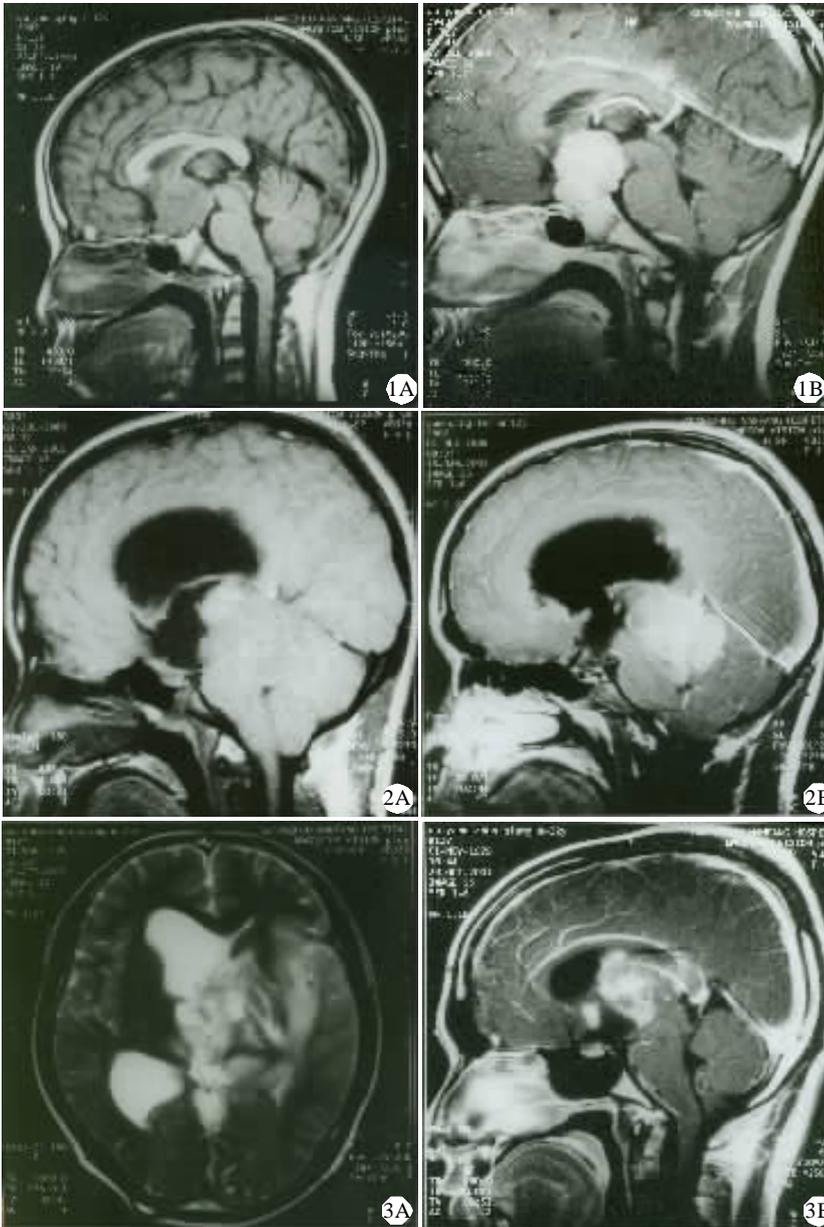


图 1 鞍区生殖细胞瘤渊2 岁女冤
 Fig.1 Germinoma in sellar region
 (Female,12yearsold)

A: On T₁-weighted sagittal image, the tumor is irregular without edema; B: On Gd-DTPA-enhanced T₁-weighted sagittal image, the tumors are strongly enhanced

图 2 松果体区生殖细胞瘤渊男性,12 岁冤
 Fig.2 Germinoma in the pineal region
 (Male,12yearsold)

A: On T₁-weighted sagittal image, the lesions isointense. The aqueduct of midbrain and brain stem is compressed and dislocated; B: On Gd-DTPA-enhanced T₁-weighted sagittal image, the tumors are strongly enhanced. The metastatic lesion are seen in the wall of lateral ventricle of the brain

图 3 左侧丘脑基底节区生殖细胞瘤
 渊男性,22 岁冤

Fig.3 Germinoma in the left thalamus and basal ganglia (Male,22yearsold)

A: T₂-weighted axial image demonstrates a heterogeneously high intensity tumor with edema and mass effect; B: On Gd-DTPA-enhanced T₁-weighted sagittal image, the tumor is enhanced heterogeneously. The metastatic nodular lesion is seen in the sellar region and wall of lateral ventricle of the brain

3 讨论

3.1 发生与病理

Krabbe(1923)和 Glous(1931)曾把生殖细胞瘤的大上皮细胞和小淋巴样细胞镶嵌排列的组织像袁拟

为松果体胚胎发育期的组织像,并把该瘤错误地命名为松果体瘤,后来发现这种想象仅为表面的想象,细胞即为免疫反应的淋巴细胞和浆细胞,不是未发育的胚胎性松果体母细胞。现在公认,在生殖腺,男性为精原细胞瘤,女性为无性细胞瘤。在生殖腺外,从隔为生殖细胞瘤,颅内松果体区和鞍上区也为生殖细胞瘤,均倾向于中线部位,系始全潜能生殖细胞。为上述各部位肿瘤的同源细胞。松果体区的生殖细胞瘤是最常见的生殖细胞瘤,约占松果体区肿瘤的 50% 以上。曾把发生在松果体区的生殖细胞瘤称为松果体瘤,以外部者称为异位松果体瘤。近年来研究^[1]发现这类肿瘤由生殖细胞组成,经组织学与组织化学证实,与精原细胞相似,所以目前松果体瘤已被生殖细胞瘤所取代。迄今为止,已经发现与生殖细胞瘤有关的肿瘤标记物有胎盘碱性磷酸酶、LAP、血管紧张素 I 转换酶、黑色素等。

颅内生殖细胞瘤是一种少见的肿瘤,占颅内肿瘤的 0.1%~2.1%。任何年龄均可发生,但主要发生在小儿和青年人,以 10~25 岁最多见,幼儿和老年人罕见。本组病例小于 10 岁的有 1 例,0~20 岁的 11 例,24~30 岁的 5 例,大于 30 岁的仅 2 例。与国内外报导的资料相似。一般统计表明生殖细胞瘤突出地发生在男性,也有认为鞍上区的肿瘤男女无明显差别。本组资料男性 14 例,女性仅为 5 例,且这 5 例全部发生在鞍区,与文献报道相一致。

3.2 MRI 在诊断生殖细胞瘤中的价值

MRI 对软组织具有良好的分辨率,其对鞍区、脑干及肿瘤侵犯邻近结构及其范围显示十分清楚,无骨骼伪影干扰,对垂体柄的增粗、拉长、移位及垂体后叶信号的改变都可以清晰地显示出来。平扫 T₁WI 多数肿瘤为均匀等信号或略低信号,信号不均者,肿瘤内囊变、坏死等有关。T₂WI 多数肿瘤为高信号,鞍区肿瘤可清晰显示瘤体与视神经交叉的关系。D-TPA 增强扫描多数肿瘤均匀明显强化,少数为不均匀强化。MRI 在显示生殖细胞瘤的并存及种植性转移方面优于 CT。生殖细胞瘤具有多发性的特点,其多见鞍区与松果体区并存。本组有 1 例,占 5.3%。颅内生殖细胞瘤有沿脑脊液流动发生种植性转移的倾向。本组松果体区病例有 2 例发生了种植转移,占 10.53%。

总之,实质性生殖细胞瘤,不论位于松果体区或鞍上部,其影像学所见均相似,一般均呈结节或团块状,信号较均匀,边缘光滑。若有下述特点,则有利于生殖细胞瘤的诊断:①松果体区及鞍区同时发现肿瘤病灶,主要是生殖细胞瘤。②MRI 扫描显示松果体区有占位病变,明显强化,同时室管膜不规则增厚,则考虑生殖细胞瘤可能性大。

3.3 鉴别诊断

典型的生殖细胞瘤的诊断主要根据其生长部位、

肿瘤的信号特点及其邻近结构的形态改变和随脑脊液在蛛网膜下腔或脑室内种植转移的特点。临床诊断时需按肿瘤部位分别与以下病变鉴别。鉴别困难时可试行试验性放射治疗。鞍区生殖细胞瘤鞍鞍扩大,垂体消失,咽管瘤,其囊变率较高而且范围较大,常伴有片状或壳状钙化,鞍结节脑膜瘤,肿瘤与颅底骨结构关系密切,常伴骨质增生,有假包膜和供血瘤床,视神经胶质瘤,肿瘤发生于视神经呈浸润生长,肿瘤占位效应明显,瘤周多有水肿带。动脉瘤,鞍上动脉瘤起源于 Willis 环或颈内动脉虹吸部,多为类圆形或浆果样,可见流空现象,若有附壁血栓形成,在 T₁WI 和 T₂WI 均为高信号,易于生殖细胞瘤鉴别。松果体区胶质瘤,来源于胼胝体压部或四叠体板,呈浸润性生长, MRI 显示信号不均匀,瘤周多有水肿带,而生殖细胞瘤除囊变外,一般均为均匀信号,无水肿带,脑膜瘤,由天幕发展而来,边界光滑,均匀,无浸润, MRI 冠状面和矢状面均可帮助明确肿瘤来源。畸胎瘤,多数有囊变,含有三个胚层成分,信号最不均匀,脂肪在 T₁WI 和 T₂WI 均表现为高信号。丘脑基底节区胶质瘤,胶质瘤瘤体 T₁弛豫时间较生殖细胞瘤长,病变的占位效应和周围水肿更为显著。原发性恶性淋巴瘤,免疫功能低下的患者多见,长 T₁,长 T₂,不均匀信号,病灶周围水肿显著和范围广泛。

参考文献

咱暂 黄文清. 神经肿瘤病理学. 第 2 版. 北京: 军事医学科学出版社, 2001. 631-6.

咱暂 Takakura K. Intracranial germ cell tumors. Clin Neuro Surg, 1985, 32(2): 429-44.

咱暂 沈天真, 陈星荣. 中枢神经系统计算机体层摄影和磁共振成像. 上海医科大学出版社, 1991. 217-9.

咱暂 Fujimaki T, Matsutani M, Funada N, et al. CT and MRI features of intracranial germ cell tumors. Neurooncol, 1994, 19(3): 217-26.

咱暂 Moon WK, Chang KH, Han MH, et al. Intracranial germinomas: correlation of imaging finding with tumor response to radiation therapy. Am J Roentgenol, 1999, 172(3): 713-6.

咱暂 Ochiai H, Yamakawa Y, Fukushima T, et al. Delayed resolution of intracranial germinoma after radiotherapy: a preliminary study of the correlation between histology and magnetic resonance imaging. Neuropathology, 2000, 20(3): 190-6.

咱暂 Suzukik, Sonobe M, Matsatani M, et al. Suprasellar cystic germinoma. Childs Nerv Syst, 1999, 15(2): 134-6.

咱暂 Kilgore DP, Strother CM, Starshak RJ, et al. Pineal germinoma: MR imaging. Radiology, 1986, 158(2): 435-8.

咱暂 林 燕, 高培毅. 小儿基底节及丘脑肿瘤的 MRI 诊断. 中华放射学杂志, 1999, 33(8): 515-9.

Lin Y, Gao PY. MR imaging study of tumors originating in the basal ganglia and thalamus in children. Chin J Radiol, 1999, 33(8): 515-9.

咱暂 Kim DJ, Yoon PH, Ryu YH, et al. MRI of germinomas arising from the basal ganglia and thalamus. Neuroradiology, 1998, 40(8): 507-11.

癫痫过程和抗癫痫药物治疗对泌乳素分泌的影响

王明芳 第一军医大学南方医院南方 PET 中心 广东 广州 510515 冤

摘要 目的 探讨癫痫发作和抗癫痫药物治疗对泌乳素 PRL 分泌的影响 方法 利用 RIA 法测定癫痫发作前后和应用不同抗癫痫药物治疗的癫痫患者血清中 PRL 水平 结果 癫痫发作后 PRL 分泌明显升高 发作后 15min PRL 分泌达到峰值 是基础 PRL 水平的 5.1 倍 发作后 90min 有 89.4% 的病例 PRL 水平下降 癫痫发作后血清 PRL 水平的变化与癫痫病灶位置无关 失神性癫痫发作后血清 PRL 水平不升高或升高不明显 而其他类型的癫痫发作后均可引起血清 PRL 水平升高 苯妥英钠 丙戊酸钠 单一治疗和马西平 + 丙戊酸钠 + 苯妥英钠联合治疗后血清 PRL 水平降低 单纯中药治疗不影响垂体 PRL 的分泌 结论 癫痫发作和抗癫痫药物治疗均明显影响垂体 PRL 的分泌

关键词 癫痫 抗惊厥药 催乳素

中图分类号 R347.513;R742.1;R971.6 文献标识码 冤 文章编号 000-2588 冤 002 冤 8-0742-03

Effect of seizures and antiepileptic drugs on prolactin secretions

WANG Ming-fang

NanfangPETCenter,NanfangHospital,FirstMilitaryMedicalUniversity,Guangzhou510515,China

Abstract: Objective To study the effect of seizures and antiepileptic drugs on prolactin (PRL) secretions. Methods Serum PRL level was measured by radioimmunoassay in 110 epileptic patients who received different treatment protocols with antiepileptic drugs (AEDs), and the test was also performed in 64 of these patients before and after seizures. Another 21 untreated epileptic patients and 42 healthy subjects served as the control groups. Results Serum PRL level was significantly increased after seizures, which peaked at 15 min postictal and attained the levels more than 5-fold the baseline in 59 patients. At 90-minute postictal, PRL levels decreased in 57 patients and dropped within normal range in 38 patients. The changes of hormone levels correlated significantly with the types of seizures. The basal PRL levels in patients with exclusive phenytoin (PHT) or valproate (VPA), and in those with combined administration of carbamazepine (CBZ+VPA+PHT), were significantly lower than the control levels ($P < 0.05$). Patients receiving treatment with traditional Chinese medicine had comparable serum PRL levels with the normal control group ($P > 0.05$). Conclusion Seizures of epilepsy and medication with AEDs given as either monotherapy or polytherapy affect the secretion of PRL in the pituitary, but traditional Chinese medicine therapies does not.

Key words: epilepsy; anticonvulsants; prolactin

泌乳素 PRL 是由垂体前叶 PRL 细胞分泌的一种多肽 它与性激素一起对促进乳腺的发育起关键作用 此外还具有其他重要作用 如应激反应 调节卵巢功能等 遥 PRL 的分泌受下丘脑产生的 PRL 释放因子与抑制因子调节 某些生理因素如睡眠 应激 妊娠 哺乳及性活动可引起 PRL 分泌增高 遥自 1978 年 Trimble 首次报道癫痫发作可引起 PRL 升高以来 国外许多研究者对此进行了大量研究 然而 这些研究并没有系统探讨癫痫发作类型 病灶位置 抗癫痫药物对 PRL 分泌的影响 遥本研究除观察癫痫发作前后血清 PRL 水平变化外 还较系统地研究了发作类型 病灶位置 抗癫痫药物和纯中药治疗对 PRL 分泌的影响 遥

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 癫痫病人组 为本院就治疗的 131 例癫痫患者 其中男 83 例 女 48 例 平均年龄 25.8 岁 8~43 岁 袁所有病例均经 MRI 尧 T 尧 PET 尧 电子发射计算机断层显像 (PET) 尧 PECT 尧 4 h 动态 EEG 或皮层 EEG 等检查 袁诊断明确 尧 肾功能正常 尧 除癫痫外无其他内分泌系统疾病 遥另外 袁病人除用抗癫痫药物外 袁服用其他影响内分泌的药物 遥根据治疗情况 袁将本组病人分为抗癫痫药物治疗组和癫痫对照组 遥

1.1.1.1 抗癫痫药物治疗组 选择治疗方案明确 单一或联合治疗的 110 例癫痫病人作为研究对象 袁分为 7 组 遥单一卡马西平 渊BZ 冤治疗组 院 5 例 袁其中男 16 例 女 9 例 袁每天的平均治疗剂量为 渊25 依 44 冤 ng 渊00~600mg 冤 渊单一苯妥英钠 渊HT 冤治疗组 院 例 袁其中男 6 例 女 3 例 袁每天的平均治疗剂量为 渊30 依 2 冤 ng 渊00~300mg 冤 渊单一丙戊酸钠 渊PA 冤治疗组 院 5 例 袁其中男 8 例 女 7 例 袁每天的平均治疗剂量为 渊92 依 266 冤 ng 渊00~1200mg 冤 渊CBZ+VPA 联合治疗组 院 7 例 袁其中男 11 例 女 6 例 袁每天的平均治疗剂量 CBZ 为 渊55 依 71 冤 mg 袁 PA 为 渊84 依 71 冤 mg 渊BZ

收稿日期 院 001-12-08

作者简介 院 王明芳 渊963- 冤 男 袁 1993 年毕业于西北师范大学生物技术专业 尧 主管技师 尧 电话 院 20-61642127 尧 E-mail: mfwang@china.com

癫痫发作类型影响 PRL 的分泌 $t=4.441$ $P=0.003$ 表 3 显示失神性癫痫发作后血清 PRL 水平不升高或升高不明显而其他类型的癫痫发作后均可引起血清 PRL 水平升高其中以全身性强直阵挛性发作复杂部分性发作部分性继发全身性发作类型的癫痫发作后血清 PRL 水平升高幅度较大单纯部分性发作后血清 PRL 水平升高幅度较小

表 3 癫痫发作类型对癫痫发作后 PRL 水平的影响
Tab.3 Effects of different seizure types on postictal serum prolactin levels

Seizure type	n	Prolactin peak values (ng/L)
GTCS	18	50.2 \pm 0.1*
CPS	21	44.8 \pm 0.0*
SPS	10	42.4 \pm 7.0*
PS/GS	10	44.7 \pm 7.3*
AS	5	11.2 \pm 7.7

* $P < 0.01$ vs AS. GTCS: Generalized tonic-clonic seizures; CPS: Complex partial seizures; SPS: Simple partial seizures; AS: Absentia seizures. PS/GS: Partial seizures (CPS or SPS) with a secondarily generalized tonic-clonic seizures

2.4 抗癫痫药物治疗对 PRL 分泌的影响

本研究观察了 96 例接受抗癫痫药物单一和 / 或联合治疗 4 例接受纯中药治疗的癫痫患者血清 PRL 水平结果见表 4 抗癫痫药物治疗明显影响 PRL 的分泌 $t=3.367$ $P=0.001$ 在 PHT 组 VPA 单一组和 CBZ+PHT+VPA 联合治疗组中血清 PRL 水平显著低于癫痫对照组纯中药治疗组 PRL 水平与癫痫对照组和正常对照组均无显著性差异可见 VPA 单一治疗和 CBZ+VPA+PHT 联合治疗后可以明显影响垂体 PRL 的分泌使血清 PRL 水平降低而纯中药治疗不影响垂体 PRL 的分泌

表 4 抗癫痫药物治疗对基础 PRL 水平的影响
Tab.4 Effects of different treatment protocols with antiepileptic drugs on baseline PRL levels

Group	n	Prolactin values (mg/L, Mean \pm SD)
Healthy volunteers	42	11.3 \pm 6.6
Patients control	21	10.1 \pm 6.6
CBZ monotherapy	25	10.4 \pm 9.9
PHT monotherapy	9	5.2 \pm 4.4* [#]
VPA monotherapy	15	5.8 \pm 7.4* [#]
CBZ+VPA polytherapy	17	10.6 \pm 2.2
CBZ+PHT polytherapy	19	10.4 \pm 3.3
CBZ+PHT+VPA polytherapy	11	4.6 \pm 1.1* [#]
TCM treatment	14	10.7 \pm 2.2

* $P < 0.05$ vs patient control group; [#] $P < 0.01$ vs healthy volunteers; [§] $P < 0.05$ vs TCM treatment group; $P < 0.05$ vs CBZ group; $P < 0.05$ vs CBZ+VPA group; $P < 0.05$ vs CBZ+PHT group. CBZ: Carbamazepine; PHT: Phenytoin; VPA: Valproate; TCM: Traditional Chinese medicine

本研究发现 92.2% 的病例癫痫发作后血清 PRL 水平升高癫痫发作后 15min 血清 PRL 水平达到峰值是发作前基础水平的 5.1 倍发作后 30min 血清 PRL 水平是发作前基础水平的 4.6 倍比 Malkowicz 等^[10]报导的 3 倍高 Malkowicz 报导数小可能与其研究病例数相对少有关癫痫发作期间 PRL 过度释放的机制还不清楚有人^[11]认为发作放电可使杏仁核和海马活化而引起癫痫发作后 PRL 水平升高我们认为癫痫发作作为一种对机体强烈有害的刺激通过脑干的网状结构上传至下丘脑同时因癫痫放电刺激经大脑边缘系统下传至下丘脑引起下丘脑 - 垂体轴的兴奋下丘脑分泌的 PRL 释放激素增加引起垂体对 PRL 的分泌增加造成血清中 PRL 水平一过性增加另外由于多巴胺含量减少 5-羟色胺水平减低或者下丘脑中多巴胺或 5-羟色胺通路受阻^[12]影响了下丘脑 - 垂体轴调节反馈作用从而使 PRL 呈过度分泌趋势

有文献报道癫痫发作后 60min 血清 PRL 下降至发作前基础水平^[13]本研究发现发作后 15min 有部分病人的血清 PRL 水平开始下降随发作后时间的延长血清 PRL 水平下降的病例逐渐增多发作后 PRL 水平降低一方面是由于负反馈调节恢复高的 PRL 水平迅速产生强反馈抑制另一方面是由于发作的耗竭垂体的应答能力迅速降低或缺失最终导致 PRL 水平下降影响 PRL 分泌的因素较多有作者^[14]报道发作类型病灶位置病灶周围组织状况以及抗癫痫药物等可影响 PRL 应答在癫痫发作期间颞叶癫痫患者发作后 PRL 水平上升的频率比额叶多并且发现非抽搐癫痫状态后或失神性发作后血清 PRL 水平不升高本研究结果表明癫痫发作后 PRL 水平没有表现出癫痫病灶位置的差异而明显表现出发作类型的差异可能是各自观察的病例数及病人其他方面的状态发作间期的长短抗癫痫药物的治疗等差异所致

抗癫痫药物对不同激素释放作用的影响不同抗癫痫药物对下丘脑 - 垂体轴的影响机制还不清楚 Isojarvi 等^[15]研究发现在接受 PHT 单一治疗的病人中血清基础 PRL 浓度降低而接受其他抗癫痫药物治疗的癫痫病人血清 PRL 水平未发现明显改变在 CBZ 治疗的男性病人中血清基础 PRL 水平低于未治疗的癫痫病人然而 Francesch 等^[16]发现 CBZ 治疗后血清 PRL 水平显著增高对于这些相互矛盾的结果我们目前还无法解释 CBZ 具有 5-羟色胺能活性 5-羟色胺通过调节下丘脑漏斗结节多巴胺能通路使多巴胺对垂体分泌 PRL 的抑制作用减弱

低温保存有活性同种带瓣主动脉治疗复杂先天性心脏病附 2 例报告

骆学全袁 文袁 波袁 陈华增袁 强生廷袁 肇庆市第一人民医院心胸外科袁 广东 肇庆 526021

摘要 目的 总结低温保存有活性同种带瓣主动脉 cryopreserved viable aortic homograft (VAH) 治疗复杂先天性心脏病的临床经验。方法 CVAH 取自 35 岁以下脑死亡或临床死亡 3 h 以内的非心血管疾病及非传染性疾病供体。处理后置入液氮中低温保存。使用时置于 37~42 益恒温箱中水浴解冻。受体 1 例为先天性心脏病右室双出口并肺动脉狭窄。冠状动脉异常。VAH 用作心外管道重建右室-肺动脉连接。另 1 例为重症法乐四联症。VAH 用作带瓣跨肺动脉瓣环补片扩大右室流出道。结果 CVAH 保存良好。手术治疗近远期效果良好。结论 CVAH 在治疗复杂先天性心脏病重建右室-肺动脉通道时是一种良好的材料。

关键词 同种主动脉移植术 低温保存 心脏缺损 先天性 右室双出口 法乐氏四联症

中图分类号 R654.2;R725.4;R726.5 文献标识码 A 文章编号 000-2588(2002)08-0745-03

Cryopreserved viable pedicled aortic homografts for complex congenital heart diseases: report of 2 cases

LUOXue-quan, ZHANG Wen, ZHANG Bo, CHEN Hua-zeng, QIANG Sheng-ting

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, First People's Hospital of Zhaoqing City, Zhaoqing 526021, China

Abstract: Objective To report the authors' experience in treating complex congenital heart diseases with cryopreserved viable pedicled aortic homografts (CVAHs). Methods CVAHs were obtained within 3 h after death of donors younger than 35 years old due to non-cardiovascular and non-infectious diseases. After routine treatment, the homografts were cryopreserved in liquid nitrogen and thawed in 0.9% sodium chloride solution at 37 to 42 益 before use. A CVAH was used as a valved conduit to connect the pulmonary artery and right ventricle in one case of double-outlet right ventricle, pulmonary stenosis and coronary artery deformation. In another case of severe tetralogy of Fallot, a CVAH was used as a valved patch to enlarge the right ventricle outlet. Results The homografts were preserved satisfactorily. The surgical results of the 2 cases with congenital heart diseases were satisfactory in perioperative and follow-up periods. Conclusion CVAH is a good substitute to rebuild right ventricle-pulmonary artery connection in treatment of complex congenital heart diseases.

Key words: aortic homografts; cryopreservation; heart defects, congenital; double outlet right ventricle; tetralogy of Fallot

我院自 2000 年 3 月至 2001 年 2 月期间袁利用低温保存有活性同种带瓣主动脉 cryopreserved viable aortic homograft, CVAH 治疗复杂先天性心脏病 2 例袁取得较好的近远期效果袁现报告如下。

1 一般资料

1.1 CVAH 的制备和选择

供体为 35 岁以下脑死亡或临床死亡 3 h 以内的非心血管及非传染性疾病患者。在无茵条件下采取带瓣主动脉袁置入 pH7.3 的抗生素营养液中袁益恒温灭菌 2.4 h。取小块主动脉组织送细菌培养和病理检查以证实其未受污染和组织结构正常后袁在营养液中加入 10% 小牛血清和二甲基亚砷袁 5 min 后将 CVAH 移入 -40 益冰箱袁以 1~1.5 益/min 降温袁 2 h 后置入 -196 益液氮中保存。

术中根据病人的血型和心血管解剖尺寸选择同一血型及直径和长度合适的 CVAH。使用时将 CVAH 从液氮中取出袁置于 37~42 益恒温箱中水浴解冻袁检查瓣膜功能良好并再次送细菌培养和病理检查。备查袁检查结果均正常。

1.2 临床资料

例 1 男袁 6 岁。患者生后 6 月始袁哭闹或受凉后气促袁紫绀明显袁休息后可缓解。近 2 年症状加重袁并头晕。体格检查袁口唇及四肢末梢紫绀明显袁胸骨左缘第 3 肋间可闻及芋~遇级收缩期杂音袁并可扪及震颤。实验室检查袁红细胞计数 8.94伊 10¹²/L, 红细胞容积 67.6%, 血红蛋白 199g/L, 血型血型。心电图袁右房右室肥大伴右室劳损。超声心动图袁右室双出口并肺动脉狭窄, 室间隔缺损直径 2.6cm, 主动脉发自右室并与二尖瓣失去纤维联系, 肺动脉瓣及主干细小亦发自右室。胸 X 光片袁双肺血少, 心胸比率 0.5, 心影顺时针旋转。曾行心导管检查袁但因术中出现低血压, 3kPa, 并有恶心、呕吐、胸闷、头晕等症状, 中止检

收稿日期 002-01-17

作者简介 骆学全, 男, 1955 年, 广东肇庆人, 1978 年毕业于中山医科大学, 现任肇庆市第一人民医院心胸外科主任, 电话 0758-2860615

查术前诊断先天性心脏病右室双出口并肺动脉狭窄病人在全麻低温体外循环下手术术中探查见一较大冠状动脉支横跨右室流出道经低位右室切口避免切断冠状动脉支剪除右室前壁过多肌束后用一较大的涤纶补片修补室间隔缺损并将主动脉口隔入左室将肺动脉根部切断连续缝合封闭近心端将制备好的 CVAH 瓣环直径 2.5cm 主动脉直径 2.0cm 主动脉长 7.0cm 血型 B 型远端与肺动脉远端对端吻合后再将 CVAH 的瓣环端及其相连的二尖瓣大瓣与右室流出道切口吻合重建右室与肺动脉的连接体外循环时间 160min 主动脉阻断时间 95min 术后诊断先天性心脏病右室双出口并肺动脉狭窄冠状动脉异常病人术后恢复顺利紫绀心脏杂音及震颤消失术后 15d 痊愈出院出院前复查心脏 B 超重建之右室流出道通畅未见心内残余分流未见 CVAH 瓣膜处有返流术后 18 月随访心功能玉级活动后未见心悸紫绀等症

例 2 女 8 岁患儿出生后 1 个月出现口唇青紫手脚指趾端紫绀并有活动后气促且逐渐加重喜蹲踞体格检查呼吸较急促 40 次/min 口唇及四肢末梢显著紫绀杵状指趾端明显第 2 肋间胸骨左缘可闻及 2/6 级收缩期杂音并及震颤肝肋缘下 3.0cm 实验室检查红细胞计数 $6.88 \times 10^{12}/L$ 血红蛋白 206g/L 红细胞容积 61.2% 血型 B 型心电图示右房右室肥大超声心动图法乐四联症室间隔缺损直径 2.2cm 主动脉骑跨约 60% 肺动脉干狭窄直径约 0.8cm 心脏 X 光片心胸比率 0.56 心腰凹陷双肺血少心血管造影示室间隔缺损直径 1.74cm 左室发育小主动脉根部前移骑跨约 70% 右室流出道肌壁厚狭窄肺动脉主干直径 1.13cm 右肺动脉 1.23cm 左肺动脉 1.17cm 术前诊断先天性心脏病法乐四联症病人在全麻低温体外循环下手术术中探查同术前检查外可见未闭动脉导管直径约 0.3cm 卵圆孔未闭直径约 0.3cm 经跨肺动脉瓣环右室流出道-肺动脉切口缝合未闭动脉导管剪除肥厚壁束和隔束后用涤纶补片修补室间隔缺损将一条同血型 CVAH 剪开修剪成一 8cm 大小带单瓣补片同时保留二尖瓣大瓣作扩大右室流出道用一枚跨瓣补片体外循环时间 107min 主动脉阻断时间 68min 术后诊断先天性心脏病法乐四联症合并动脉导管未闭卵圆孔未闭患儿术后四肢末梢及口唇红润心脏杂音基本消失术后第 7 天出现双侧胸腔积液以右侧为主经留置胸腔闭式引流管引出淡黄色胸液每天平均约 250 ml 术后近 1 月胸液逐渐消失术后 48d 痊愈出院出院前复查 B 超示肺动脉瓣处有非常少的返流右室流出道

直径约 2.3cm 术后 8 个月随访病人心功能玉级活动后无气促紫绀等症状

3 讨论

3.1 液氮深低温保存 CVAH 的优点

液氮深低温保存 CVAH 是近年来国内外治疗复杂心脏病的一种新兴技术 CVAH 的临床应用有一个发展过程最早用于临床的是即刻取自脑死亡病人的新鲜同种移植物后改为 4 益短时间保存但因早期瓣膜失去功能而放弃改用液氮深低温保存后发现其良好的功能可维持 10 年以上究其原因可能为液氮深低温保存改变了其抗原性使植入后不再或少发生排斥反应液氮深低温保存了血管内皮瓣叶上皮的细胞活性使其植入后具有新陈代谢和修复功能

CVAH 具有生物活性和组织结构的完整性完整的瓣膜功能能从解剖和血流动力学上纠正心脏畸形近期效果非常满意另外 CVAH 的抗感染能力较强术后感染率低于人工机械瓣带瓣管道术后不需要抗凝带异种生物瓣的涤纶人工血管远期毁损率较高有文献报道 50% 的儿童病人 8 年后需做二次手术而 CVAH 的 10 年再手术率仅为 28% 可见 CVAH 在治疗复杂先天性心脏病方面明显优于其他带瓣管道

3.2 液氮深低温保存 CVAH 存在的问题

采用 CVAH 治疗复杂先天性心脏病远期随访发现有发生钙化的可能特别是 3 岁以下的儿童更易发生钙化的发生率远远低于猪瓣膜加涤纶人工血管的发生率且钙化多发生在主动脉壁对瓣膜的功能没有影响国外有文献报道 CVAH 移植 3 年的钙化发生率为 15% 但更长期随访表明这种改变并不影响血流动力学的效果无破裂及感染等并发症动脉壁也不会因此而变弱不需要再次手术 CVAH 的瓣膜也可能发生退变脱落出现关闭不全这主要与供体的年龄及瓣膜内皮细胞活性有关温度也会影响瓣膜的活性因此本组病人均采用温盐水恒温下快速复温以保持细胞活性

目前多数学者认为同种带瓣主动脉为低抗原性并认为经深低温保存后其抗原性进一步减低还有人主张尽量选用血型相容配型也有学者认为移植后是否产生组织损害与血型相容无关考虑到免疫抑制治疗的不利影响我们术后未予免疫抑制治疗近期未发生排斥反应远期效果还有待进一步观察

3.3 液氮深低温保存 CVAH 在复杂先天性心脏病外科治疗中的应用

在治疗重症法乐四联症和典型的右室双出口中主要是利用 CVAH 加宽右室流出道及肺动脉或恢复

右室与肺动脉之间的连接袁同时利用其所带的瓣膜袁减少肺动脉返流遥这样可明显改善右心功能袁减少低心排的发生遥因为根治术后袁左右心室分开射血袁肺循环阻力过大同时肺动脉瓣显著关闭不全时袁将导致右心系统呈充血性心力衰竭状态袁而左心系统则呈低血容量性低心排状态袁术后死亡率很高遥在重症或复杂的先天性心脏病病例袁估计肺循环阻力较大时袁一个关闭良好的肺动脉瓣将有利于病人渡过术后危险期遥本组两例中袁例 1 是利用 CVAH 重建右室与肺动脉之间连接同时纠正了肺动脉干的狭窄曰例 2 是利用经过裁剪的带有完整单瓣的 CVAH 作一跨瓣补片袁扩大右室流出道袁尽管该病人术前身体和心功能很差袁术后合并有顽固性胸腔积液等并发症袁但经过治疗后痊愈出院遥两例术后超声心动图检查均未见明显肺动脉瓣返流袁右室流出道直径分别为 1.9尧3cm袁随访效果优良遥我们认为 CVAH 在治疗复杂先天性心脏病重建右室 - 肺动脉通道时是一种良好的材料遥

参考文献

责任编辑 隋开颜 冤

渊上接 744 页冤

致 PRL 分泌增加遥因此袁在 CBZ+VPA尧CBZ+PHT 联合治疗组中袁不引起 PRL 水平的明显降低遥而 VPA尧PHT 是一种 酌氨基丁酸的激动剂袁而 酌氨基丁酸是具有控制 PRL 释放的抑制因子袁故在 VPA尧PHT尧CBZ+VPA+PHT 治疗组中袁PRL 水平降低遥我们还发现袁经纯中药治疗后袁PRL 水平与正常对照组无显著性差异袁因此袁中药治疗不仅具有临床价值袁而且对癫痫病人的垂体功能不会产生明显的抑制作用遥另外袁本研究结果提示袁合理应用抗癫痫药物袁不仅对治疗和控制癫痫具有良好的临床效果袁而且可以使抗癫痫药物对垂体的毒副作用减低到最低程度遥

致谢 本研究在山东淄博万杰医院完成袁在此感谢该院癫痫治疗研究中心和核医学科的工作人员遥

参考文献

咱暂 杨 纲. 内分泌生理与病理生理学咱暂天津科技出版社, 1996. 94-137.

咱暂 O' Brien MF, Stafford EG, Gardner AH, et al. A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allografts valves, with a note on chromosomal studies咱暂 Thorac Cardiovasc Surg, 1987, 94(6):812-5.

咱暂 Zavzava N, Simon A, Maller-Ruchholtz A, et al. Evidence that the degeneration of heart valve grafts is immunologic咱暂 Transplant Proc, 1995, 27(3):2107-8.

咱暂 Jonas RA, Freed MD, Mayer JE, et al. Long-term follow-up of patients with synthetic right heart conduits咱暂 Circulation, 1985, 72 (Suppl):77-9.

咱暂 Knott-Craig CJ, Elkins RC, Santangelo KL, et al. Aortic valve replacement: comparison of late survival between autografts and homografts咱暂 Ann Thorac Surg, 2000, 69(5):1327-32.

咱暂 Fontan F, Choussat A, Deville C. Aortic valve homografts in the surgical treatment of complex cardiac malformations咱暂 J Thorac Cardiovasc Surg, 1984, 87(5):649-57.

咱暂 李温斌, 王盛宇, 陈宝田. 同种异体主动脉及瓣膜内皮细胞活性测定方法的初步探讨咱暂 心肺血管病杂志, 1994, 13(1):10-1.

咱暂 Kadner A, Chen RH, Mitchell IRN, et al. Homograft cross matching is unnecessary due to the absence of blood group antigens咱暂 Ann Thorac Surg, 2001, 71(5 Suppl):S345-52.

咱暂 Bauer J. Interactions between hormones and epilepsy in female patients咱暂 Epilepsia, 2001, 42(Suppl 3):20-2.

咱暂 Malkowicz DE, Legido A, Jackel RA, et al. Prolactin secretion following repetitive seizures咱暂 Neurology, 1995, 45(3):448-52.

咱暂 Lin YY, Su MS, Yiu CH, et al. Relationship between mesial temporal seizure focus and elevated serum prolactin in temporal lobe epilepsy咱暂 Neurology, 1997, 49(2):528-32.

咱暂 Petty RG. Prolactin and antipsychotic medications: mechanism of action咱暂 Schizophr Res, 1999, 35(Suppl):S67-73.

咱暂 Lusic I, Pintaric I, Hozo I, et al. Serum prolactin levels after seizure and syncopal attacks咱暂 Seizure, 1999, 8(4):218-22.

咱暂 Meierkord H, Shorvon SD, Lightman S, et al. Comparison of the effects of frontal and temporal lobe partial seizures on prolactin levels咱暂 Arch Neurol, 1992, 49(3):225-30.

咱暂 Isojarvi JIT, Pakarinen AJ, Myllyla VV. Thyroid function with antiepileptic drugs咱暂 Epilepsia, 1992, 33(2):142-8.

咱暂 Franceschi M, Perego L, Cavagnini F, et al. Effect of long-term antiepileptic therapy on the hypothalamic-pituitary axis in man咱暂 Epilepsia, 1984, 25(1):46-52.

咱暂 Murialdo G, Galimberti CA, Gianelli MV, et al. Effect of valproate, phenobarbital, and carbamazepine on sex steroid set up in women with epilepsy咱暂 Clin Neuropharmacol, 1998, 21(1):52-8.

细胞间粘附分子 -1 单抗防治初发期急性肾小管坏死的实验研究

刘俊¹ 袁力¹ 袁小宁² 第一军医大学¹ 南方医院肾内科袁生物技术中心袁广东 广州 510515 冤

摘要目的 探讨白细胞的粘附在初发期急性肾小管坏死(ATN)冤的病理生理学过程中所起的作用遥方法 Wistar 雄性大鼠 32 只袁随机分为 4 组遥肌肉注射甘油制作 ATN 动物模型袁应用细胞间粘附分子 -1 单抗防治初发期大鼠 ATN 袁观察其肾脏病理学及血尿素氮和血肌酐变化遥结果 给药 24 h 后治疗组血肌酐值[渊12.31 依 4.42 冤渊mol/L)]明显低于 CD3 对照组血肌酐[渊90.21 依 71.25 冤渊mol/L)](P<0.05)遥模型组与 CD3 对照组可见明显肾小管坏死袁而治疗组仅 2 例出现较轻的坏死灶遥结论 白细胞的粘附在 ATN 发病过程中具有重要作用袁应用细胞间粘附分子 -1 单抗阻断白细胞的粘附能明显减轻肾脏病理改变遥

关键词粘附分子 单抗 抗体 肾小管坏死 急性

中图分类号 院 392.11;R692.6 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588 渊2002 冤 8-0748-03

Experimental study of monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule -1 for incipient acute tubular necrosis

LIU Jun¹, WANG Li¹, WANG Xiao-ning²

Department of Nephrology, Nanfang Hospital¹, Center of Biological Techniques², First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To explore the role of leukocyte adhesion in the pathophysiology of glycerol-induced acute renal tubular necrosis (ATN). Methods Rat models of ATN were established by intramuscular injection of glycerol in 24 Wistar rats, which were divided randomly into 3 groups of equal number according to the agents co-injected with glycerol for the prevention of ATN, with another 8 rats serving as normal control. One of the 3 groups received a monoclonal antibody (mAb) against intercellular adhesion molecule-1 (anti-ICAM-1) and another received CD3 mAb, leaving one group untreated. Both functional impairment and histological changes in the rats were observed. Results Plasma creatinine measured 24 h after the injection of glycerol was 412.31 依 4.42 渊mol/L) in rats treated with anti-ICAM-1, significantly lower than that in CD3 mAb-treated rats (990.21 依 71.25 渊mol/L, P<0.05). Moderate to severe necrosis in the outer renal medulla with frequent mitoses was present in rats with ATN receiving CD3 mAb or nothing, but only mild necrosis with few mitoses occurred in merely 2 of those rats with anti-ICAM-1 treatment. Conclusion Leukocytes and adhesion molecules play critical roles in the pathophysiology of glycerol-induced ATN, and anti-ICAM-1 which blocks the adhesion of the leukocytes may alleviate the pathological changes in the kidney.

Key words: adhesion molecule; monoclonal antibody; renal tubular necrosis

急性肾小管坏死 (acute tubular necrosis, ATN) 是一种严重疾病袁其病理学机制目前仍不十分清楚袁特效治疗阻止其进展袁病死率较高遥研究人员认为当初发期 ATN 尚未明显发生病理变化之前袁能及时给予恰当的药物治疗袁 ATN 有可能逆转或使其病情减轻遥 Kelly 等^{渊1)}最新研究发现袁白细胞的粘附在肾脏缺血 - 再灌注损伤中起至关重要的作用遥白细胞与各种细胞间的粘附主要由 CD11a/CD18 (淋巴细胞功能抗原 -1, LFA-1) 尧 CD11b/CD18 和 CD11c/CD18 这 3 种茁整合素介导袁细胞间粘附分子 -1 (ICAM-1) 是 CD11a/CD18 和 CD11b/CD18 的配基袁 ICAM-1 与 CD11/CD18 间的相互作用对介导白细胞与内皮细胞粘附起决定性作用遥本实验应用 ICAM-1 单抗防治

初发期大鼠 ATN 袁以评价粘附分子在 ATN 发病过程中的作用袁也为临床上防治 ATN 提供新线索遥

1 材料和方法

1.1 主要试剂

ICAM-1 单抗由 Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA 赠送袁为美国 ATCC 公司单克隆细胞株刺激小鼠所产生的腹水 (内含小鼠抗大鼠 ICAM-1 单抗) 袁由第一军医大学生物技术中心纯化遥 CD3 单抗由该生物技术中心提供遥甘油为分析纯试剂袁生理盐水稀释成 50% 溶液遥

1.2 动物分组及治疗方案

32 只 Wistar 雄性大鼠购自第一军医大学实验动物中心袁体重 16~180 g 袁实验前禁水 16 h 遥随机分为 4 组袁每组 8 只遥

收稿日期 院 001-12-23

作者简介 院 刘俊 渊1962- 冤 男袁山东龙口人袁 1985 年毕业于第一军医大学袁硕士袁副教授袁主任医师袁电话 院 20-61641609

1.2.1 模型组 大鼠每 100g 体质量肌肉注射 50% 甘油 1ml 分两侧臀部肌肉注射 1 次

1.2.2 正常对照组 肌肉注射生理盐水 1 次剂量与方法同模型组

1.2.3 治疗组 注射甘油的同时尾静脉注射 ICAM-1 单抗 1mg

1.2.4 CD3 单抗对照组 注射甘油同时尾静脉注射 CD3 单抗 1mg

1.3 观察项目及方法

全部动物于实验后 24h 杀死取心脏抽血 1ml 测尿素氮 BUN 肌酐 Cr 同时取肾脏作病理检查肾小管病变根据病变范围分为病灶占 1/3 以下为轻度 1/3~2/3 为中度 2/3 以上为重度连续观察 10 个高倍视野发现肾小管坏死则为阳性坏死则为阴性连续观察 10 个低倍视野中肾小管管型数目记录其平均值荧光显微镜下观察切片中肾小管区荧光着色强度分为阴性轻度中度和重度

1.4 统计学处理

完全随机设计的方差分析及 SNK 多重比较等级资料比较的秩和检验及扩展 t 检验做多重比较应用 SPSS10.0 统计软件处理

2 结果

32 只大鼠实验期间无 1 只死亡各组 BUN 肌酐 Cr 值见表 1 各组大鼠肾小管病理改变见表 2 各组大鼠肾小管区 ICAM-1 表达见表 3

表 1 各组大鼠 BUN 肌酐 Cr 均值 渊依冤
Tab.1 The average values of BUN and Cr of rats in each group (Mean依D)

Table with 3 columns: Group, BUN(mmol/L), Cr(滋mol/L). Rows include Normalcontrol, Model, Anti-ICAM-1treatment, and Anti-CD3control.

*P<0.05,**P<0.01 vs normalcontrol; #P<0.05, ##P<0.01 vs model; P<0.05, P<0.01 vs anti-ICAM-1treatment.BUN: Bloodureanitrogen;Cr:Creatinine;ICAM-1:Intercellualr adhesionmolecule-1

表 2 各组大鼠肾小管病理变化
Tab.2 Pathological changes in the renal tubular of rats in each group

Table with 5 columns: Group, Degeneration (-, +, ++, +++), Casts, Necrosis (n, %). Rows include Normalcontrol, Model, Anti-ICAM-1treatment, and Anti-CD3treatment.

*P<0.05,**P<0.01 vs normalcontrol; #P<0.05, ##P<0.01 vs model; P<0.05, P<0.01 vs anti-ICAM-1treatment

表 3 各组大鼠肾小管区 ICAM-1 表达
Tab.3 Expression of ICAM-1 in the renal tubular areas of rats in each group

Table with 5 columns: Group, Fluorescence stains (-, +, ++, +++). Rows include Normalcontrol, Model, Anti-ICAM-1treatment, and Anti-CD3treatment.

*P<0.05,**P<0.01 vs normalcontrol; #P<0.01 vs model; ##P<0.01 vs anti-ICAM-1treatment

3 讨论

注射甘油制作的鼠 ATN 模型与某些临床上的 ATN 很近似特别是与严重创伤引起的 ATN 相似肌肉注射甘油后能引起肌肉细胞坏死和肌红蛋白尿造成注射局部的体液积聚使已禁水 16h 的大鼠血容量更加降低一般认为注射甘油引起 ATN 的发病机制与肾血流量不足肾脏血管收缩肌红蛋白尿和血红蛋白尿等因素有关在初发期肾血管收缩是主要致病原因 Ayer 等的动物实验证实注射甘油 10min 后肾血流量已明显减少特别是肾皮质的肾血流量减少更加显著目前大多数学者认为肾血流量减少是 ATN 初发期的肾小球滤过率降低的主要原因

中性粒细胞介导的血管内皮功能受损内皮对缺氧和乙酰胆碱所激发的血管扩张反应不敏感可导致进一步的缺血性损伤活化的中性粒细胞粘附性增加在缺血部位聚集与凝聚的血小板和红细胞结合可导致毛细血管物理性阻塞而且浸润到组织内的中性粒细胞通过 CD18-ICAM-1 依赖的途径粘附于组织细胞并释放细胞毒性物质造成组织细胞损伤 Smith 等认为未受刺激的中性粒细胞与内皮细胞的粘附是通过 CD11a/CD18-ICAM-1 间的相互作用趋化刺激后的中性粒细胞与纯化的 ICAM-1 或内皮细胞粘附则通过 CD11a/CD18-ICAM-1 和 CD11b/CD18-ICAM-1 两种途径相连接而且细胞因子刺激后的组织细胞表面也可表达 ICAM-1 与中性粒细胞表面 CD18 复合体相结合造成组织细胞损伤因此应用 CD18 单抗或 ICAM-1 单抗的任何一种均可高效地阻止中性粒细胞与内皮细胞的粘附及阻止其后的氧自由基释放 Argenbrigt 等在体内实验及 Yoshida 等在体外实验中均证实应用 ICAM-1 单抗可抑制中性粒细胞与内皮细胞的粘附性缺血性损伤明显减轻 Yoshida 应用 ICAM-1 单抗治疗其他脏器的缺血 / 再灌注损伤也取得了一定的疗效

本实验结果初步表明白细胞和粘附分子在初发期 ATN 的病理生理学过程中起重要作用 ICAM-1 单抗可明显减轻 ATN 大鼠的病理损伤而使肾功

能明显恢复遥

参考文献院

咱暂 KellyKJ, WinferdW, WilliamsJR, et al. Antibodytointercellular adhesionmoleculeIprotectsthekidneyagainstischemicinjury咱暂 ProcNatlAcadSciUSA,1994,91(2):812-6.

咱暂 Chihara Y, Yamada Y. Immunoglobulinsuper family咱暂 Nippon Rinsho,1999,57(s):421-3.

咱暂 ReinechHJ. Sequential studiesonpathophysiology of glycerol-induceacuterenalfailure咱暂 LabClinMed,1980,96(2):356-62.

咱暂 SchrierWR. Acuterenalfailure咱暂 AMA,1982,247(18):2518-22.

咱暂 AyerG, GrandchampA, WylerT, et al. Intrarenalhemodynamicsin glycerol-induced myohemoglobinuric acuterenalfailureintherat咱暂 CircRes,1971,29:128-32.

咱暂 Furchgott RF, VanhouttePM. Endothelium-derivedrelaxingand contractingfactor咱暂 FASEBJ,1989,3(9):2007-18.

咱暂 EbgkerFL, AlperCE, BrovsD, et al. Roleofleukocytesinthe responsetoacutemyocardialischemiaandreflowindogs咱暂 Am J

Physiol,1986,251(2):H314-23.

咱暂 SmithCW, EntmanML, LaneCL, et al. Adherenceofneutrophilsto canine cardiac myocytes in vitro is dependent on intercellular adhesionmolecule-1咱暂 ClinInvest,1991,88(4):1216-23.

咱暂 SunFF, LaiDS, YueG, et al. Patternofcytokineandadhesion moleculemRNAinhapten-inducedrelapsingcoloninflammationin therat咱暂 Inflammation,2001,25(1):33-45.

咱暂 MaXL, DavidJ, AllanM, et al. Coronaryendothelialandcardiac protectiveeffectsof monoclonal antibodytointercellular adhesion molecule-1inmyocardialischemiaandreperfusion咱暂 Circulation, 1992,86(3):937-46.

咱暂 ArgenbrightLW, Letts LG, RothleinR. Monoclonal antibodyto the leukocyte membrane CD18 glycoprotein complex and to intercellular adhesion molecule-1 inhibit leukocyte-endothelial adhesioninrabbits咱暂 LeukBiol,1991,49(3):253-7.

咱暂 YoshidaN, SmithE, FaullRJ, et al. Anoxia/reoxygenation-induced neutrophiladherencetoculturedendothelialcells咱暂 AmJPhysiol, 1992,262(6):H1891-8.

血浆置换治疗血栓性血小板减少性紫癜 2 例报告

尹 芳 袁凡义 袁淑芸 袁京娜 袁军体 袁富 (第一军医大学南方医院血液科 袁广东 广州 510515)

摘要院对 2 例治血栓性血小板减少性紫癜 TTP 患者每天进行血浆置换 渊治疗袁每次清除及补充 1 个血浆量 袁为 40 ml/kg 新鲜冰冻血浆 袁并补充红细胞悬液 渊E 后临床症状迅速消失 袁实验室检查基本恢复正常 袁随访无复发 袁表明 PE 明显优于传统治疗方法 袁能改善 TTP 的预后遥

关键词院血浆置换 渊血栓性血小板减少性紫癜

中图分类号院 558.2 文献标识码院 文章编号院 000-2588(2002)08-0750-02

Plasma exchange for thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 2 cases

YINFang, MENG Fan-yi, ZHOUSHu-yun, NIUJing-na, LIJun-ti, LIUFu

Department of Hematology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Twopatientswiththromboticthrombocytopenicpurpura(TTP)weretreatedwithdailyplasmaexchangewithfresh frozen plasmaoftheplasmavolumeofthebody(40mg/kg袁b.w.),incombinationwithredbloodcelltransfusion.Theclinical symptoms resolved immediately and the parameters of laboratoryexaminationimprovedpromptlyafterthe treatment, and follow-up of the 2 patients revealed no recurrent TTPepisodes. This result indicates that plasma exchange isobviously superior totreatmentmodalitiesandhassignificantlychangedthecourseofTTP.

Key words: plasmaexchange; thromboticthrombocytopenicpurpura

血栓性血小板减少性紫癜 渊thromboticthrombocytopenic purpura, TTP 冤是一种少见 袁起病急及病死率极高的疾病 遥本研究应用血浆置换 渊plasmaexchange, PE 冤治疗 2 例经肾上腺皮质激素及抗血小板聚集药物治疗无效的 TTP 患者均获成功遥

1 病例资料

收稿日期院 002-02-13

作者简介院 尹 芳 渊969- 冤女 袁湖南益阳人 袁 1992 年毕业于第一军医大学 袁主治医师 袁讲师 袁电话院 20-85147185

例 1 女 袁 1 岁 袁因头晕 袁乏力 袁皮肤瘀斑 5 d 于 2000 年 8 月 22 日入我院 遥患者曾于 1995 年患胆结石 渊胆囊炎 冤 月前顺产健康 4.5kg 男婴 遥查体 渊意识清楚 袁烦躁不安 袁中度贫血貌 袁全身皮肤散在瘀斑 袁巩膜轻度黄染 袁神经系统及全身其他查体未见异常 遥血象 WBC 11.1 伊 10⁹/L 袁 Hb 73g/L 袁 PC 16 伊 10⁹/L 袁 Ret 3% 袁 袁见有核红细胞 袁异形红细胞 0.05 渊棘形 袁盔形 袁泪滴状 冤 遥尿蛋白 渊+ 冤 袁尿液镜检 2~3 个 /HP 袁血清总胆红素 44.0 兹 mol/L 渊正常值 1.7~17.1 兹 mol/L 冤 袁直接胆红素 8.3mol/L 渊正常值 0~6 兹 mol/L 冤 袁间接胆红素 35.7 兹 mol/L 渊正常值 5.1~13.7

泌 1.0 mol/L 尿酸 0.28 mol/L 乳酸脱氢酶 1087 U/L 正常值 109~245 U/L Coombs 试验阴性 游离血红蛋白 1134 mg/L (正常值 < 40 mg/L) 凝血指标无异常 骨髓增生明显活跃 粒细胞 0.28 粒细胞 0.61 粒细胞 0.47 确诊血小板减少性紫癜原因待查 Evans 综合征 原发性血小板减少性紫癜合并自身免疫性溶血性贫血 入院后应用氢化考的松 200 mg/d 烦躁不安 进行性加重 继而神志丧失 但未出现病理体征 入院第 3 天测脑压为 220 mmH₂O 正常值 70~180 mmH₂O 脑脊液蛋白 0.22 g/L 潜血 1.5~0.45 g/L 葡萄糖 3.29 mmol/L 氯化物 120 mmol/L 20~130 mmol/L 脑电图示异常 确诊为急性原发性 TTP 加用甘露醇脱水 抗血小板聚集药物 潘生丁 阿司匹林等治疗 疗效差 入院后第 6 天开始连续进行 PE 3 次 每次清除及补充 1 个血浆量 为 40 ml/kg 新鲜冰冻血浆 并补充红细胞悬液 800 ml 治疗后临床症状消失 脑电图仍有轻度异常 其余实验室检查均恢复正常 住院 16 d 出院 出院后至今良好

例 2 女 4 岁 因 头 晕 痛 热 2 月 余 经 量 多 皮 肤 瘀 斑 半 月 余 意 识 不 清 1 周 于 2000 年 9 月 22 日 由 外 院 转 入 我 院 曾 予 地 塞 米 松 水 抗 血 小 板 聚 集 及 抗 感 染 等 治 疗 病 情 无 好 转 既 往 身 体 健 康 查 体 体 温 38.3 益 重 度 贫 血 貌 昏 迷 状 全 身 皮 肤 散 在 瘀 斑 侧 瞳 孔 等 大 对 光 反 射 存 在 软 心 肺 正 常 脾 未 及 肢 肌 张 力 明 显 减 低 肌 力 减 弱 腱 反 射 明 显 减 低 左 巴 彬 氏 基 征 阳 性 尿 潜 血 象 院 VBC 22.1 伊 0% 尿 白 蛋 白 59 g/L 尿 糖 8 伊 0% 尿 酮 体 3% 偶 见 到 有 核 红 细 胞 尿 沉 淀 碎 片 占 0.045 尿 蛋 白 尿 沉 淀 镜 检 1~3 个 / 高 倍 镜 尿 素 氮 12.0 mmol/L 正常值 3.6~7.1 mmol/L 肌 肝 86 泌 1.0 mol/L 正常值 44~133 泌 1.0 mol/L 血清总胆红素 19.4 泌 1.0 mol/L 直接胆红素 4.2 泌 1.0 mol/L 间接胆红素 15.2 泌 1.0 mol/L DH-L525 U/L Coombs 试验阴性 游离血红蛋白 26.3 mg/L 凝血指标无异常 骨髓取材部分血液稀释 系增生偏高 脑压为 110 mmH₂O 脑脊液蛋白 0.97 g/L 葡萄糖 4.4 mmol/L 氯化物 121 mmol/L 脑电图示正常 IRI 发现左额叶异常信号 性质考虑为脑组织退行性改变 诊断急性原发性 TTP 入院后第 3 天开始连续进行血浆置换 6 次 每次清除及补充 1 个血浆量 为 40 ml/kg 新鲜冰冻血浆 并补充红细胞 800 ml 置换 PE 完毕后每天输冷上清血浆 700 ml 左右 共 4900 ml 联合长春新碱 2 mg 每周 1 次 缓慢静脉滴注 入院第 7 天意识清楚 临床症状缓解 第 15 d 血小板恢复正常 住院 20 d 出院 各项实验室检查均正常

2 讨论

TTP 又称 Moschcowitz 综合征 其临床特点为微血管病性溶血性贫血 血小板减少性紫癜 神经精神异常 肾脏损害及发热 本文 2 例患者起病急 病情重 具有典型的 TTP 特征 第 1 例患者在入院时误诊为 Evans 综合征 随着神经系统症状的出现和对破碎红细胞的认知 才明确 TTP 的诊断 该病须注意与 Evans 综合征及其他血小板减少性紫癜鉴别 TTP 少见 近年来本病有上升趋势 病因与发病机理尚不清楚 可能的诱因有感染 最常见的是细菌或病毒感染 其次是药物 抗血小板药物 肝素 阿司匹林 等 其它诱因有肿瘤 器官移植 妊娠 自身免疫性疾病等 最近的研究表明 全身性内皮细胞损伤是 TTP 发病的中心环节 从 TTP 患者

脾脏微血管内皮细胞上可观察到凋亡 而从 TTP 患者体内分离的血浆也可引起其他微血管内皮细胞的凋亡 内皮损伤后可释放比正常血浆中血管性血友病因子 更多的 vWF 多聚体 血浆中 vWF 蛋白酶能降解 vWF 而 TTP 患者血浆中缺乏这种特异性蛋白酶 由此可引起更大的 vWF 多聚体形成 导致了血小板的聚集和小血管上血栓形成

TTP 的传统治疗方法包括抗凝及抗血小板药物 脾切除 合并肾上腺皮质激素 输注血浆等 但疗效差 病死率高达 54.0%~93.7% 应用 PE 近二十年来 TTP 的治疗得到明显的改善 有效率由原来的 10% 提高到 80% 以上 PE 作用机制是补充 vWF 蛋白酶 恢复血液循环内 vWF 正常的降解 当患者接受 PE 治疗后 血浆中的 vWF 蛋白酶可恢复到正常水平 但 TTP 复发时 血浆中检测不到 vWF 蛋白酶 PE 所用的置换液有新鲜冰冻血浆和冷上清血浆两种 冷上清血浆是去除了包含 vWF 多聚体 纤维蛋白原和纤维连接蛋白等冷沉淀物的血浆 上清部分 从理论上讲 冷上清血浆由于去除了 vWF 多聚体 似乎优于新鲜冰冻血浆 随机试验显示两者在疗效上无差别 例 2 曾使用冷上清血浆输注 但不能看出其优于新鲜冰冻血浆

PE 开始后 神经系统症状往往最快缓解 血小板恢复常常需要几天 溶血的指标如血清乳酸脱氢酶水平也能很快恢复 贫血有可能加重 需要输注红细胞 其中血小板计数恢复正常意味着 TTP 缓解 有相当一部分患者会复发 对血象和乳酸脱氢酶的监测有助于尽早发现复发 TTP 患者尽量不要输血小板 因为已有报道输血小板可加重血栓形成 例 1 由于发现早 治疗及时 仅进行 3 次 PE 便使病情缓解 例 2 发病后诊断及治疗实施较晚 经 6 次 PE 后 临床症状虽然缓解 但血小板计数恢复时间较长 因此早期诊断和治疗至关重要

参考文献

- Dang CT, Magid MS, Weksler B, et al. Enhanced endothelial cell apoptosis in splenic tissues of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 1999, 93: 1264-70.
- Mitra D, Jaffe EA, Weksler B, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura and sporadic hemolytic-uremic syndrome plasma induce apoptosis in restricted lineages of human microvascular endothelial cells. *Blood*, 1997, 89: 1224-34.
- Lian EC. Thrombotic thrombocytopenic purpura: a syndrome caused by multiple pathogenetic mechanisms. *Invest Clin*, 2001, 42(5): 75-86.
- Tsai HM. High titers of inhibitors of von Willebrand factor-cleaving metalloproteinase in a fatal case of acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*, 2000, 65(3): 251-5.
- 王振义, 李家增, 阮长耿, 等. 血栓与止血基础理论与临床. 第 2 版. 上海科学技术出版社, 1996: 244-50.
- Zeigler ZR, Shadduck RK, Gryn JF, et al. Cryoprecipitate poor plasma does not improve early response in primary adult thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Clin Apheresis*, 2001, 16(1): 19-22.
- Bell WR, Braine HG, Ness PM, et al. Improved survival in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med*, 1991, 325: 398-403.

疗袁方法为 ATG 100mg 静脉滴注, 每日 1 次, 或 OKT35mg 静脉滴注袁每日 1 次遥对上述治疗无效的难治性 AR袁将 CSA 停用 24h 后转化为 FK506袁调整浓度在 8~10ng/dl 遥

1.4 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件袁用计数资料的 字检验遥

2 结果

86 例 AR 病人中袁8 例在术后 SCr 未降至正常时发生 AR袁其中 9 例在术后 SCr 持续不降袁8 例术后 SCr 降至正常后发生 AR遥

在一线应用 MP 冲击治疗的 68 例发生 AR 病人中袁8 例成功逆转袁0 例不能逆转者中 14 例进一步用 ATG 治疗袁其中 10 例成功逆转袁 例疗效差袁 例进一步用 OKT₃ 治疗袁其中 4 例成功逆转袁 例失败遥在一线应用 ATG 治疗的 11 例中袁 1 例失败遥一线应用 OKT3 治疗的 7 例病人中仅 1 例失败遥见表 1 遥

表 1 86 例移植肾 AR 的治疗结果

Tab.1 Results of the treatment of 86 cases of acute rejection after renal transplantation

Treatments	n	Treatmentsuccess	Treatmentfailure
MP	7	48	20
OKT3first-line	6	6	1
OKT3second-line	6	4	2
ATGfirst-line	11	10	1
ATGsecond-line	14	9	4
CSAreplaced bytacrolimus	6	2	4

以诊断 AR 时的 SCr 为基础值袁在应用 MP 治疗成功的 48 例病人中袁1 例在冲击治疗的第 2 尧天 SCr 升高 < 基础值伊 0%, 仅 7 例冲击治疗的第 2 尧天 SCr 升高 > 基础值伊 0% 曰一线应用 MP 治疗不能逆转的 20 例病人袁8 例在治疗的第 2 尧天 SCr 升高 > 基础值伊 0% 袁 2 例 < 基础值伊 0% 遥

在 8 例难治性 AR 病人中袁应用 CSA 作为基础免疫抑制治疗者 6 例袁全部转换为 FK506 治疗袁根据血谷值浓度调整用量袁其中 2 例 AR 得到控制遥共 6 例因 AR 不能控制而切除移植肾袁其中 2 例肺部严重感染袁 例尿路感染袁 例移植肾破裂袁 例血管栓塞遥

一线和二线共有 38 例应用 ATG 或 OKT3 治疗袁逆转成功 30 例袁失败 8 例遥检测该 38 例受者治疗后第 4 尧天 Scr 水平袁0 例成功者中有 26 例 Scr 已有降低袁 8 例失败者中 7 例 Scr 无明显改变或继续升高袁 1 例 Scr 有所降低袁但因继发肺部严重感染 Scr 再次上升遥

3 讨论

MP 冲击治疗仍然是针对 AR 的常用有效措施袁Gaber 等^[1]报告袁R 发生时其使用率为 88% 袁R 逆转率为 70% 袁本组病例分别为 79.1% 袁1% 遥MP 的应用方法为多为 0.5 VD 1/d 伊 d 袁袁我在诊断 AR 后的第 1 天给以 0.5 g 袁第 2 尧天分别给以 0.25 g 袁也有同样良好的效果袁而且由于用量减少袁可能的副反应也相应减少遥在治疗过程中发现袁应用 MP 治疗期间袁病人 SCr 会有所升高遥我们认为袁冲击治疗的第 2 尧天 SCr 上升幅度小于基础值的 10%, 则说明 AR 得到控制曰如大于 10% 袁R 多不能逆转袁统计结果表明两者差别具有显著性意义 渊字=17.53 袁<0.001 冤遥同样 Gaber 等^[1]的研究也证实了类似的结果遥

ATG 和 OKT3 可以作为一线抗 AR 治疗用药袁且有显著疗效袁amath 等^[2] 报告其有效率为 67% ~98% 遥本组 18 例一线给以 ATG 或 OKT3 袁有 2 例不能逆转袁有效率为 88.8% 袁发生 AR 时 Scr 分别为 323.2 滋mol/L 和 385.6 滋mol/L 袁说明发生 AR 时 Scr 较高则疗效较差遥本研究结果还证实袁在应用 ATG 或 OKT3 5 d 时 Scr 降低者 AR 多能逆转袁而应用 5 d 后 Scr 维持不变或反而升高者袁R 多不能逆转袁两者具有统计学意义 渊字=9.51 袁=0.002 冤袁与 Gaber 等^[1] 的研究结论相同遥ATG 和 OKT3 对于 MP 冲击无效的 AR 亦有良好效果袁本组 20 例应用 MP 无效袁进一步应用 ATG 或 OKT3 治疗袁有 14 例成功逆转遥由于 ATG 和 OKT3 价格昂贵且副作用多袁我们主张其作为二线治疗药物袁应用于严重的 AR 复发的 AR 或激素抵抗性 AR 遥

评价 AR 治疗结果应该用 Scr 的变化值而不是其绝对值袁因为后者易受 AR 的严重程度以及 AR 发生后诊断时间的影响袁Guttman 等^[3]也具有相同观点遥

难治性排斥反应通常是指给以 MP 1.0g 冲击治疗后的第 3 天袁scr 仍有较大幅度升高袁且如不采用其他抗排斥治疗仍持续升高者^[4]遥给以抗 T 淋巴细胞制剂有一定的逆转率袁但仍有一部分患者不能恢复遥我们对这些病人采用改换基础免疫抑制的治疗措施袁将经上述治疗失败的 6 例应用 CSA 作为基础免疫抑制的病人改换为 FK506 遥根据血谷值浓度调整用量袁其中 2 例成功逆转袁不能逆转的 4 例病人在发生 AR 时 Scr 值均大于 256 滋mol/L 袁说明这种治疗措施有一定的效果袁尤其是在发作 AR 时基础 Scr 值较低者袁曰基础 Scr 值较高袁疗效不明显遥有项研究表明袁8% 的患者将 CSA 改换为 FK506 时袁R 得到控制袁而 11% 维持稳定袁1% 进一步恶化袁恶化的危险因素是发作 AR 时的 Scr 水平袁3 g/L 者 3% 恶化袁而 >5g/L 者 23% 恶化^[5]遥

总之,AR 是肾移植术后常见的排斥反应,如诊断治疗不当可严重影响移植肾功能。本文总结治疗 AR 的逆转成功率达 94%。原因是我们及时诊断和治疗,及时发现疗效较差者及时更换治疗措施,并且应避免过大免疫抑制剂剂量而引起感染等并发症。

参考文献

咱暂 GaberAO, MooreLW, SchroederTJ. Observations on recovery of renal function following treatment for acute rejection. *咱暂 Am J*

Kidney Dis, 1998, 31(Suppl1):S47-59.

咱暂 KamathS, DeanD, PeddiVR, et al. Efficacy of OKT3 as primary therapy for histologically confirmed acute renal allograft rejection. *咱暂 Transplantation*, 1997, 64(10):1428-32.

咱暂 GuttmanRD, SouillouJP, MooreLW, et al. Proposed consensus for definitions and endpoints for clinical trials of acute kidney transplant rejection. *咱暂 Am J Kidney Dis*, 1998, 31(Suppl1):S40-6.

咱暂 WoodleES, ThistlethwaiteJR, GordonJH, et al. A multicenter allograft rejection - Are part of the Tacrolimus Kidney Transplantation Rescue Study Group. *咱暂 Transplantation*, 1996, 62:594-9.

全心外右心旁路手术 1 例报告

Right heart bypass by extracardiac approach: report of one case

蔡开灿 袁武军 袁立志 袁彭月华 袁第一军医大学南方医院胸心血管外科 袁广东 广州 510515 袁

关键词 全心外右心旁路术 完全性大动脉转位 阻塞

中图分类号 R654.2 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2002)08-0754-01

1 临床资料

患者女, 6岁, 因活动后心慌, 短 16 年, 于 2001 年 3 月 18 日入院。入院查体: 血压 15/11kPa, 脉搏 88 次/min, 意识清醒, 唇明显紫绀, 心尖搏动位于右侧第五肋间锁骨中线内 2cm 处, 触及细震颤, 心界叩诊不大, 心率 88 次/min, 律齐, 心尖区及胸骨左缘第二肋间可闻及 3/6 级收缩期杂音, 指趾端明显紫绀, 杵状指趾, 双下肢无水肿。入院期间行血气检查示动脉血氧饱和度 76.8%。右心导管选择性心室造影, 心脏超声检查, 腹部超声检查, 胸部 X 线检查, 提示: 先天性心脏病变, 右位心, 心房, 心室, 肺动脉瓣狭窄, 存在上腔静脉完全性大动脉转位, 肺动脉转位。

于 2001 年 4 月 2 日在全麻体外循环, 心脏不停跳下行全心外右心旁路术。术称全心外腔静脉肺动脉连接术。于上腔静脉处插入静脉引流管, 于主动脉处插供血管, 开始常温下体外循环, 分别阻断上腔静脉, 阻断升主动脉, 心脏不停跳, 于右侧上腔静脉近心房处切断, 用 4-0 prolene 线连接缝闭近心端, 用 5-0 prolene 线将远心端与右肺动脉行端侧吻合, 切断肺动脉根部, 用 4-0 prolene 线连续缝闭近心端, 自体心包修补远心端并关闭, 切断下腔静脉, 用 4-0 prolene 线连接缝闭近心端, 用 3-0 Gore-Tex 线将远心端与 2.0cm Gore-Tex 人工血管行端端吻合, Gore-Tex 血管另一端与左肺动脉行端侧吻合, 切断左上腔静脉, 用 4-0 prolene 线连续缝闭近心端, 用 5-0 prolene 线将远心端与左肺动脉行端侧吻合。待手术完毕, 分别开放上腔静脉, 检查吻合口无出血, 待循环稳定, 逐渐停机, 拔管, 辅助循环 193min, 上腔静脉阻断 60min, 下腔静脉阻断 129min, 术后病人恢复良好, 无并发症发生。随访 11 个月, 患者生活质量明显提高, 动脉血氧饱和度为 96%, 超声心动图显示人工血管通畅, 功能正常。

2 讨论

全腔静脉肺动脉连接术由于在心房内建立了侧隧道, 避免了单心室等多种复杂先心病的手术疗效有了很大的改善, 但仍存在主动脉阻断时间过长导致心肌缺血, 且由于心房内管道或隧道的原因, 术后可能导致肺静脉回流及房室瓣受累, 尤其是在小心房者, 加之心内过多的缝合及人工材料等异物更易引起血栓, 栓塞, 心律失常。针对以上问题, Marcelletti^[1], Laschinger^[2]等先后报告了全心外腔静脉肺动脉连续术, 进一步提高了手术的疗效。

全心外腔静脉肺动脉连接术的优点: 避免了或缩短了阻断主动脉时间, 全心外腔静脉肺动脉连接术, 除了需要扩大房缺或室缺, 或有其他畸形需矫正, 必须阻断主动脉外, 大部分病人可不阻断升主动脉, 在心脏跳动下进行手术, 避免因心脏停跳导致的心肌缺血以及心肌再灌注损伤, 这对高危病人来说十分重要。本例病人即在心脏跳动下进行手术, 术后恢复良好, 避免了部分病人不需行心内操作, 而避免了因损伤的心内组织引起的各种心律失常, 避免了心内无隧道及管道等异物, 因此减少了心房内血栓产生和体循环的栓塞, 同时也避免了对肺静脉, 房室瓣, 冠状静脉窦的梗塞。对于右心房容积小或合并肺静脉异位引流畸形者, 该手术方法更为适用。

全心外腔静脉肺动脉连接术潜在危险之一是由于管道内膜形成而致管道狭窄, 术后应适当抗凝。本例随访 11 个月, 未见血栓形成, 同时, 患儿生长发育, 管道不匹配, 存在再次手术的可能。

参考文献

咱暂 MarcellettiC, CornoA, GiannicoS, et al. Inferior Vena cava-pulmonary artery extracardiac conduit: a new form of right heart bypass. *咱暂 J Thorac Cardiovasc Surg*, 1990, 100:228-32.

咱暂 LaschingerJC, RingelRE, BrennerJI, et al. Extracardiac total cavo-pulmonary connection. *咱暂 Ann Thorac Surg*, 1992, 54:371-73.

咱暂 王伟新, 孙衍庆. 全心外右心旁路手术. *咱暂中华胸心血管外科杂志*, 1999, 15(6):376-78.

收稿日期 002-03-12

作者简介 蔡开灿, 男, 浙江温州人, 1993 年毕业于第四军医大学, 主治医师, 电话 20-61641888-87240

心脏移植术后非排异期超声心动图表现特点渊附 1 例报告冤

张 振¹袁王武军¹袁邹小明¹袁谢志斌²渊第一军医大学南方医院¹ 胸心外科袁心内科袁广州 广东 510515冤

摘要目的 动态观察原位心脏移植术后 1 年内不同时间段移植心脏超声心动图表现袁研究心脏移植术后非排异期超声心动图表现特点遥方法 应用 Acuson 彩色多普勒超声心动图诊断仪观察房室腔大小尧室壁及室间隔厚度尧二尖瓣及三尖瓣血流频谱尧左室肌质量及肌质量指数袁计算不同时间段数值平均值并同术前供体作对照遥结果 患者在术后 1 年长期存活袁无急性排斥反应发生遥超声心动图监测表现为左室尧右室及右房内径显著下降袁而左房内径则显著上升尧室间隔尧左室后壁及右室前壁厚度显著增加尧左室肌质量及肌质量指数显著增加尧二尖瓣 E尧A 峰及三尖瓣 E 峰均显著下降袁三尖瓣 A 峰变化不明显遥术后 4 个月出现二尖瓣反流袁术后持续存在三尖瓣反流遥结论 心脏移植术后非排异期的形态尧结构及功能具有特殊性袁某些特点类似早期急性排斥反应袁最终确诊尚需心内膜心肌活检遥

关键词心脏移植;超声心动图;移植排斥

中图分类号 R540.45;R654.2 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2002)08-0755-03

Echocardiographical features during the rejection free period after heart transplantation: report of one case

ZHANGZhen¹, WANGWu-jun¹, ZOUXiao-ming¹, XIEZhi-bin²

Departments of Cardiothoracic Surgery¹ and Cardiology², Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou510515, China

Abstract: Objective To study the echocardiographic features during the period free of acute allograft rejection after heart transplantation by monitoring one patient within one year after heart transplantation. Methods The dimension of atrial and ventricular, interventricular septal and ventricular wall thickness, blood flow pattern through the mitral and tricuspid valves, left ventricular muscle weight (LVMW) and LVMW index during different periods were measured by echocardiography, and all these data were compared with those of the donor before operation. Results The patient recovered well without any sign of acute rejection. Echocardiography revealed that the dimension of right atrial, left and right ventricles decreased significantly while left atrial showed significant increase, with obvious increase in the interventricular septal and ventricular wall thickness. LVMW and LVMW index were also significantly increased. The peaks E- and A- wave velocities of the mitral and tricuspid E peak flow velocity decreased significantly, while the A peak flow velocity of the tricuspid did not undergo any significant changes. Mitral back flow occurred 4 months after the operation and tricuspid back flow persisted after operation. Conclusions The changes of morphology, structure and function of the transplanted heart during periods without rejection are to some extent specific to this special phase, when some of these changes are similar to those during early acute rejection, and correct diagnosis relies on endo-myocardial biopsy.

Key words: heart transplantation; echocardiography; graft rejection

心脏移植术后由于手术影响及供心对受体循环系统的不适应袁导致心脏在形态尧结构及功能方面均发生一定的变化遥超声心动图在心脏移植术后的监测中得到了越来越广泛的应用袁其优点是无创性及避免产生感染尧室壁穿孔尧心律失常等并发症遥我院于 2000 年 4 月完成 1 例原位心脏移植袁存活现已超过 1 年袁术后无排斥反应发生遥现就应用超声心动图对该患者进行监测情况报告如下遥

1 病人与方法

1.1 临床资料

患者女袁 3 岁袁诊断为扩张性心肌病袁于 2000 年 4 月 5 日于我院接受同种异体原位心脏移植手术遥术后采用普乐可复尧骁悉及强的松三联免疫抑制治疗袁效果良好遥患者已存活 13 个月袁无临床急性排斥反应征象遥术后 3 个月末行心内膜活检未见急性排斥反应遥随访过程中无肝尧肾功能损害及高血压发生遥

1.2 仪器和方法

应用 Acuson 多普勒超声心动图仪渊美国 Acuson 公司冤尧探头频率 3.5MHz 遥采用 M 型超声心动图观察左室后壁尧室间隔及右室前壁厚度尧二维超声测量各房室腔内径尧脉冲多普勒测量二尧三尖瓣血流频谱尧峰峰值流速和 A 峰峰值流速遥仪器内软件系统自动计算以下指标尧左室舒张末容积尧左室收缩末容积尧左室短轴缩短率尧射血分数尧左室肌质量

收稿日期 001-11-15

作者简介 张 振渊 1976-09-09 男袁天津人袁 2001 年毕业于第一军医大学袁副主任医师袁副教授袁电话 20-61647169

VMW及左室肌质量指数 VMWI等指标遥 LVMW 根据 Devereux^[1]的公式计算袁即 LVMW= 也d+IVS+LVPW冤-Dd3页.04-14袁其中 Dd 为左室舒张末期内径袁VS 为室间隔厚度袁VPW 为左室后壁厚度袁.04 为心肌质量指数遥术前 2 d 因胸腔内气体干扰袁得到准确数据袁舍去遥

术后 1 周内每天检查 1 次袁周至 1 个月内每两天检查 1 次袁 1 个月后每周检查 1 次袁 3 个月后每月检查 1 次袁此后根据病情发展情况随时检查遥

1.3 统计学处理

根据时间不同将各项指标分为术后 4 d尧 1 周尧 2 周尧 4 周尧 8 周尧 12 周尧 3 个月尧 6 个月尧 12 个月等 8 组数据遥与供体术前超声情况作对照袁应用 SPSS9.0 统计软件包进行单样本 t 检验遥

2 结果

本例患者无排斥存活 13 个月遥在术后进行超声心动图监测中发现患者术后左房腔显著增加而右房腔尧右室腔及左室腔均显著下降遥表 1 室间隔尧左室后壁及右室前壁厚度显著增加袁分别于术后第 2 尧 4 周达到峰值袁年后除右室前壁均恢复到术前水平 遥表

2 尧 LVMW 和 LVMWI 在术后亦显著增加袁在术后第 4 周达到高峰袁年后无显著性差异 遥表 3 二尖瓣 E 尧 A 峰及三尖瓣 E 峰均显著下降袁而三尖瓣 A 峰变化不明显袁术后第 4 个月出现二尖瓣反流且逐渐上升袁三尖瓣反流持续存在袁三尖瓣反流表现为先下降后上升趋势遥表 4 遥

3 讨论

3.1 心脏移植术后各房尧腔内径变化及意义

心脏移植术后由于供心对受体循环系统的重新适应往往导致房尧腔内径在术后暂时增大遥文献报道术前存在肺动脉高压的患者袁恢复自身循环后不久即出现右心室扩张并持续较长时间袁这种扩张主要与术前存在的肺动脉高压有关遥当发生急性右心室功能衰竭时袁会出现右心室的进一步显著扩大遥本例患者术后超声监测发现左室尧右室及右房内径在术后显著下降而左房内径则显著上升袁但各组值间波动性较小且无显著性差异袁可能同患者肺动脉压力不高及无排斥反应有关遥房尧腔内径的变化可能与供心植入后位置的不同导致测量平面不同有关遥

表 1 心脏移植术后各房尧腔变化情况mm, x依冤

Tab.1 Changes in the dimension of the atria and ventricles after heart transplantation (mm, Mean依D)

Time	Leftventricle	Leftatrium	Rightventriculd	Rightatrium
Pre-operation渊control冤	43	31	34	34
Post-operation				
4days	38.00依.07	30.50依.71	27.50依.19*	1.50依.54
8days	37.00依.15*	35.25依.06	32.00依.00	29.25依.50*
2weeks	37.00依.00*	36.33依.51	24.67依.08*	28.00依.00*
4weeks	38.50依.42	38.25依.06*	28.00依.74*	27.50依.29*
2months	37.00依.00*	35.60依.13	26.00依.24*	30.40依.52*
4months	41.33依.66	37.50依.26*	27.17依.56*	28.00依.28*
8months	41.75依.96	36.50依.00*	27.00依.82*	28.75依.50*
12months	37.50依.29*	33.50依.51	26.00依.08*	28.50依.91*

*P<0.05 vs control

表 2 心脏移植术后室壁厚度变化情况mm, x依冤

Tab.2 Changes of ventricular wall and intra ventricular septa thickness after heart transplantation (mm, Mean依D)

Time	Intraventricularsepta	PosteriorwallofLV	PosteriorwallofRV
Pre-operation渊control冤	10	9	4.5
Post-operation			
4days	13.00依.15*	9.75依.96	6.45依.21*
8days	14.00依.00*	12.50依.29*	7.18依.57*
2weeks	14.00依.00*	14.00依.00*	8.57依.49*
4weeks	13.50依.00*	14.25依.00*	9.00依.00*
2months	13.80依.84*	13.60依.55*	9.00依.00*
4months	12.50依.84*	12.50依.84*	7.60依.58*
8months	10.50依.58	12.75依.19*	7.25依.46*
12months	8.75依.26	9.00依.00	6.50依.21*

*P<0.05 vs control

表 3 心脏移植术后左室肌质量及肌质量指数变化情况
Tab.3 Changes of LVMW and LVMW index after heart transplantation (Mean)

Time	LVMW(g)	LVMWI(g/m ²)
Pre-operation	128	94
Post-operation		
4days	127.75	94.00
8days	159.00	116.50
2weeks	182.33	134.00
4weeks	192.50	141.25
2months	175.40	128.60
4months	158.83	10.67
8months	142.00	104.25
12months	101.50	74.50

LVMW:Leftventricularmuscleweight;*P<0.05vs control

表 4 心脏移植术后二尖瓣血流频谱变化情况
Tab.4 Changes of mitral and tricuspid flow pattern after heart transplantation (Mean)

Time	MpeakE	MpeakA	TpeakE	TpeakA	MR	TR
Pre-operation	111	70	77	43	0	0
Post-operation					0	
4days	98.00	70.50	55.50	44.00	0	335.00
8days	78.00	60.50	55.25	55.75	0	260.00
2weeks	71.33	42.00	59.00	43.00	0	233.67
4weeks	63.00	45.75	50.50	58.00	0	244.50
2months	76.00	48.16	53.67	54.17	0	198.33
4months	63.00	78.40	49.80	38.60	351.80	233.80
8months	88.00	56.33	55.75	43.50	360.75	248.50
12months	83.75	54.00	51.25	35.00	411.67	267.33

M:Mitral;T:Tricuspid;MR:Mitralregurgitation;TR:Tricuspidregurgitation;*P<0.05vs control

3.2 心脏移植术后室间隔和室壁厚度变化及意义

长期的心功能不全及肺循环淤血使大多数接受心脏移植患者在术前存在不同程度的肺动脉高压。表 2 可以看出左心室后壁室间隔厚度及右心室室前壁在术后第 4 天均显著增加。右心室室前壁增加最为显著。分别于术后第 2 周、4 周和 2 个月时达到峰值。术前二者于术后第 8 个月和 12 个月时恢复至术前水平。后者则仍显著高于术前水平。由此可以看出心脏移植术后主要表现为右心室系统的后负荷增加以及对其适应的过程。早期的室壁增厚为急性排斥反应及同手术持续时间和心肌缺血时间有关的心肌水肿。而术后远期的室壁肥厚与高血压有关。本例患者在术后未发生排斥反应。室壁增厚可能与术前存在不同程度的肺动脉高压及供体心脏对受体循环系统的不适应而导致的代偿性肥厚有关。本例患者术后无高血压发生。室壁厚度逐渐下降。与心肌重构有关。

3.3 LVMW 及 LVMWI 的增加及意义

心脏移植术后会发生室壁增厚。根据 Devereux 公式计算出的 LVMW 同样显著增加。由表 3 可以看出 LVMW 及 LVMWI 在术后第 4~8 天开始显著增加。在术后 4 周达到高峰。较对照组增加近 50%。

后 12 个月时同术前比较无显著性差异。有文献报道当排斥反应发生时 LVMW 则进一步增加。室壁厚度及 LVMW 的变化与排斥反应的类型有关。早期排斥反应时主要是神经体液免疫反应。心肌水肿明显。室壁可增厚。心肌质量可增加。晚期时主要是细胞免疫反应。心肌质量无明显变化。本例患者术后 LVMW 及 LVMWI 显著增加。同室壁增厚在时间上一致。同术后无排斥反应相符。

3.4 心脏移植术后血流频谱变化及意义

心脏移植术后室壁的增厚首先导致心脏舒张功能减退。超声心动图表现为跨瓣血流速度的 E 峰下降及 E/A 比值的下降。有文献报道发生急性排斥反应时 E 峰升高。E/A 比值增高。同右心房压力升高及二尖瓣开放时间提前有关。本例患者术后二尖瓣 E 峰血流速度下降与室壁增厚具有时间上的相关性。可能与术后受体循环后负荷增加与室壁增厚导致的舒张性顺应性下降有关。同术后未发生急性排斥反应相符。由于吻合手术重建了形态异常的心房及双窦房结冲动发放使供-受体心房收缩不同步。术后常发生瓣膜反流。其发生率三尖瓣为 22.6%~52.6%。

地塞米松对硬膜外腔应用吗啡所致恶心呕吐的影响

吴又武 袁建设 袁仲清 袁妙宁 袁玉珍 渊第一军医大学南方医院麻醉科 袁广东 广州 510515 冤

摘要 目的 观察地塞米松对术后硬膜外腔应用吗啡镇痛引起的恶心呕吐的拮抗作用遥方法 将 84 例 ASA 分级 Ⅱ 级 需硬膜外腔阻滞麻醉下行下腹部手术的病人随机分为地塞米松组 (玉组 袁=42) 和生理盐水组 (渊组 袁=42) 遥术毕 2 组病人均经硬膜外腔注射吗啡 2mg 镇痛遥经硬膜外腔注射吗啡前 袁组静脉注射地塞米松 10mg 袁渊组静脉注射生理盐水 2ml 遥观察术后 24h 两组病人恶心呕吐的发生情况遥结果 玉组病人恶心和呕吐的发生率分别为 12% 和 7% 袁渊组病人恶心和呕吐的发生率分别为 31% 和 21% 袁渊组病人恶心和呕吐的发生率均有显著差异 渊<0.05) 遥结论 静脉注射地塞米松 10mg 可显著降低术后硬膜外腔吗啡镇痛引起的恶心呕吐的发生率遥

关键词 地塞米松 镇痛 硬膜外腔 吗啡 恶心 呕吐

中图分类号 院 614 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588 渊2002 冤 8-0758-02

Effects of dexamethasone on epidural morphine-related nausea and vomiting

WU You-wu, XU Jian-she, CHEN Zhong-qing, GU Miao-ning, WANG Yu-zheng

Department of Anesthesiology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To observe the effect of intravenous dexamethasone injections in preventing nausea and vomiting resulted from epidural morphine for post-operation pain relief. Methods Eighty-four adult patients (ASA class Ⅱ) requiring epidural anesthesia for low abdominal surgical procedures were randomly divided into 2 groups, of which Group 1 (n=42) received intravenous dexamethasone injections at 10mg and Group 2 (n=42) intravenous injection of 2ml normal saline before administration of 2mg epidural morphine for post-operation pain relief. The incidence of nausea and vomiting were recorded within 24h after surgery. Results The incidence of nausea and vomiting were 12% and 7% in Group 1, while 31% and 21% in Group 2 respectively, showing significant difference between the 2 groups (P<0.05). The total incidence of nausea and vomiting were also significantly different (19% vs 52%, P<0.01). Conclusion Intravenous dexamethasone injections at 10mg can significantly decrease the incidence of epidural morphine-related nausea and vomiting.

Key words: dexamethasone; analgesia; epidural; morphine; nausea; vomiting

由于硬膜外腔注入小剂量吗啡用于术后镇痛效果确切可靠袁方法简便易行袁已成为目前最常用的术后镇痛方法之一遥但其伴随的恶心呕吐症状的发生率高达 30%~62% 渊袁如何在提高术后硬膜外腔吗啡镇痛效果的同时减少其副作用已引起临床广泛关注遥本研究旨在观察地塞米松对减轻术后硬膜外腔吗啡镇痛引起的恶心呕吐的临床效果遥

1 对象和方法

1.1 研究对象

随机选择下腹部手术病人 84 例 袁其中男 39 例 袁女 45 例 遥年龄 21~68 岁 渊平均 38.4 岁 袁袁体质量 39~72kg 渊平均 52.8kg 袁袁ASA 分级为 Ⅱ 级 遥随机分为地塞米松组 渊玉组 袁 2 例 冤和生理盐水组 渊渊组 袁 2 例 冤 袁2 组病人性别 尧年龄 尧手术时间均无显著差异 渊所有病人均无神经系统 尧消化系统病史和药物滥用史 遥

1.2 研究方法

研究对象于术前 30min 肌注安定 10mg 尧阿托品 0.5mg 遥所有病人均进行连续硬膜外腔阻滞麻醉 袁经 T₁₂~L₁ 或 L₁~L₂ 间隙行硬膜外腔穿刺 袁向上置管 3cm 遥麻醉剂采用 2% 利多卡因 5ml 袁之后用 1.5% 利多卡因加 0.25% 丁卡因维持麻醉 袁麻醉平面控制在 T₅~L₅ 遥于手术结束前约 30min 停止硬膜外腔麻醉 袁渊组静脉注射地塞米松 10mg 袁渊组静脉注射生理盐水 2ml, 5min 后 2 组病人均经硬膜外腔注入吗啡 2mg 遥观察术后 24h 内病人有无恶心 尧呕吐 遥

1.3 统计学处理

2 组数据均以百分率 渊冤表示 袁组间比较采用卡方检验进行统计学分析 遥

2 结果

84 例病人均在硬膜外腔阻滞麻醉下顺利完成手术 遥玉组 42 例术后发生恶心 5 例 渊2% 冤 尧呕吐 3 例 渊渊% 冤 袁恶心和呕吐总计 8 例 渊9% 冤 袁渊组 42 例术后发生恶心 13 例 渊31% 冤 尧呕吐 9 例 渊21% 冤 袁恶心和呕吐总计 22 例 渊52% 冤 袁组间有显著性差异 渊<0.05 袁袁 冤

收稿日期 院 001-10-03

作者简介 院 袁又武 渊1959- 冤 男 袁湖南安人 袁1983 年毕业于第四军医大学吉林军医学院 袁主治医师 袁现在成都空军医院工作 尧电话 院 28-85399452-97351

表 1 地塞米松组和生理盐水组恶心呕吐症状的发生率
Tab.1 Incidences of nausea and vomiting between dexamethasone group and saline group

Group	Sideeffect			Total
	n	Nausea	Vomiting	
Dexamethasone	42	5(12%)	3(7%)	8(19%)
Saline	42	13(31%)	9(21%)	22(52%)
P		<0.05	<0.05	<0.01

3 讨论

硬膜外腔注入吗啡镇痛常见的副作用就是恶心呕吐,发生率高达 30%~62%,严重者增加切口疼痛甚至引起腹部切口裂开,电解质紊乱和脱水等并发症。硬膜外腔注入吗啡镇痛引起恶心呕吐的机制是由于吗啡吸收入血,或通过硬膜外腔扩散入脑脊液兴奋呕吐中枢所致。本研究生理盐水组硬膜外腔注入吗啡 2mg,恶心呕吐的发生率为 52%,与文献报告结果相似。

地塞米松的抗吐作用首先报道于 1981 年,主要用于癌症化疗病人发生的恶心呕吐。以后相继有报道地塞米松的抗吐作用等于或优于一般抗吐药。甲氧氯普安、氟哌啶、枢复宁等亦有报道地塞米松可减少全麻下腹腔镜胆囊切除术后发生的恶心呕吐。本研究组在硬膜外腔注射吗啡前静脉注射地塞米松 10mg 术后恶心呕吐发生率显著低于对照组,说明地塞米松确实具有显著的抗吐作用,并提示地塞米松对硬膜外吗啡镇痛引起的恶心呕吐有一定的预防作用。

地塞米松用于对抗癌症化疗病人发生的恶心呕吐时应用的剂量范围在 8~32mg,但一般认为 8mg 即可产生显著的抗吐作用。因此,本研究选择静脉注射地塞米松 10mg,既可显著预防硬膜外腔吗啡镇痛引起的恶心呕吐,又可防止大剂量地塞米松产生的副作用,如增加感染机会、延迟伤口愈合、刺激性溃疡和肾上腺皮质萎缩等。

氟哌啶、枢复宁等是临床上常用的抗吐药物,能有效防止硬膜外腔吗啡镇痛引起的恶心和呕吐。但应用氟哌啶抗吐时常发生椎体外系副作用,而枢复宁的价格又极为昂贵。而采用小剂量地塞米松预防硬膜外腔吗啡镇痛引起的恶心呕吐,既价格便宜又无副作用,是临床上值得推广的抗吐方法。

参考文献

Wang JJ, Hu ST, Zeng JI. Comparison of intravenous nalbuphine infusion versus naloxone in the prevention of epidural-related side effects. *Reg Anesth Pain Med*, 1998, 23(3): 479-84.

Aapro MS, Alberts DS. Dexamethasone as an antiemetic in patients treated with cisplatin. *N Engl J Med*, 1981, 305(3): 520-1.

Wang JJ, Hu ST, Liu YH, et al. Dexamethasone decreases epidural morphine-related nausea and vomiting. *Anesth Analg*, 1999, 89(1): 117-20.

Wang JJ, Hu ST, Liu YH, et al. Dexamethasone reduces nausea and vomiting after laparoscopic cholecystectomy. *Br J Anaesth*, 2000, 83(5): 772-5.

责任编辑 杨金星 冤

渊 接 757 页 冤

瓣为 13.3%~21.1%,一年后三尖瓣反流的发生率分别为 13.3%和 6.6%。本例患者术后即出现三尖瓣反流,且反流速度有逐渐降低趋势,但在 2 个月后则出现逐渐上升趋势。三尖瓣在术后第 4 个月时出现反流并逐渐加重。文献报道的下降趋势不同,但同期心功能检查均无明显异常,未出现心包积液,内膜心肌活检未发现急性排斥反应证据,是否为慢性排斥反应及纤维化导致瓣膜功能异常,尚有待进一步随访。

参考文献

邹小明,袁振,袁武军.应用彩色多普勒超声心动图监测心脏移植术后排斥反应. *第一军医大学学报* 2000, 20(5): 448-50.

Zou XM, Zhang Z, Wang WJ. Monitoring of acute rejection by Doppler echocardiography after heart transplantation. *J First Mil Med Univ*, 2000, 20(5): 448-50.

Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man: Anatomic validation of the method. *Circulation*, 1977, 55: 613-5.

Young JB, Leon CA, Short HD, et al. Evaluation of hemodynamics after orthotopic heart and heart-lung transplantation. *J Heart Transplantation*, 1987, 6(1): 34-43.

王亚芬, Habib G, Ambosi P, et al. 心脏原位移植术后非排异期多普勒超声心动图检查特征. *中国超声医学杂志*, 1996, 12(7): 13-6.

Wang YF, Habib G, Ambosi P, et al. Doppler echocardiographic study of cardiac nonrejection in cardiac allograft recipients. *Chinese J Ultrasound Med*, 1996, 12(7): 13-6.

Gill EA, Borrego C, Bray BE, et al. Left ventricular mass increases during cardiac allograft vascular rejection. *J Am Coll Cardiol*, 1995, 25(4): 922-6.

Habib G, Benichou M, Salaun-Penquer P, et al. Detection of acute rejection by echocardiography and Doppler in heart transplantation: a comparative study with the biopsy endomyocardial. *Arch Mal Coeur*, 1989, 82(9): 1535-41.

Tatou E, Charvre P. Long-term follow-up of anatomic heart transplantation. A propos of 60 patients with a mean follow-up of 36 months. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 1998, 91(7): 837-41.

责任编辑 黄开颜 冤

先天性齿槽突裂整复术渊 10 例报告冤

罗渝宁 袁少萍 袁伟忠 袁宏宇 袁天舒 渊第一军医大学南方医院口腔科袁广东 广州 510515 冤

摘要 应用自体髂松质骨髓颗粒植入整复 10 例单侧上颌齿槽突裂并关闭口鼻瘘 10 例伤口一期愈合 术后观察 3~6 个月 外观改善明显 线检查有明显骨形成 骨密度近似正常骨组织 两者间无明显界限

关键词 颌齿槽突裂 骨移植

中图分类号 R782.1;R782.2 文献标识码 文章编号 000-2588(2002)08-0760-02

Surgical correction of congenital alveolar cleft: report of 10 cases

LUO Yu-ning, LI Shao-ping, LI Wei-zhong, XUE Hong-Yu, WANG Tian-shu

Department of Stomatology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: The paper reports our experience in surgical correction of unilateral maxillary alveolar cleft complicated with oronasal fistula by iliac spongy bone marrow autografts in cases. Primary healing of the surgical wounds occurred in all the 10 cases and obvious improvement in external appearance was achieved 3 to 6 months after the surgery. Clear evidence of osteogenesis was found by X-ray examination, and the density of the newly generated bone was comparable to that of normal bones, without visible bounds between the autografts and the normal bones.

Key words: maxillary alveolar cleft; bone graft

唇腭裂术后遗留的齿槽突裂的整复 因同时涉及口腔颌面部硬软组织 牙槽突及唇颊鼻软组织 的移位及缺失 其治疗方案一直是口腔颌面外科争论较多的问题 目前多数学者认为 要获得满意的功能及外观 必须要有正畸科的合作 有计划按步骤分阶段地进行治疗 作者根据这一思想 必要的正畸治疗后 采用自体髂松质骨髓颗粒植入进行整复 取得了较满意的效果

1 临床资料

患者共 10 例 男 4 例 女 6 例 均为单侧 年龄 13~17 岁 平均 15.2 岁 早期均行唇腭裂修复 遗留有不同程度的齿槽突裂 口鼻瘘 近裂隙恒牙扭转倾斜 患侧前牙反牙 合或开牙 鼻翼基底塌陷及面中份塌陷

2 方法

2.1 术前处理

所有病例拍正侧位外观彩照 全口曲面断层片 上颌前部咬合片及邻近牙牙片 了解尖牙根形成和裂隙边缘畸形 牙错位 埋伏牙以及鼻底部垂直 牙平缺骨等情况 取石膏模型

2.2 术前正畸

根据 X 片检查及牙颌模型分析 在术前 3~6 月根据手术整复的要求排牙 主要解决牙扭转倾斜

出充分的植骨间隙 为植骨创造良好的条件 去除裂隙处的残根 乳牙及影响植骨的牙

2.3 手术

参照马莲等学者的设计方案

2.3.1 切口设计 沿裂隙边缘作深达骨面的切口 延伸至侧切牙远中 必要时可至第 1 磨牙近中区 患侧可达第 1 磨牙近中区后向上转至前庭沟

2.3.2 植骨床的形成 植骨床是以鼻腔面粘骨膜为上壁 口腔腭侧粘骨膜为下壁 患侧上颌骨段的内侧面及健侧上颌骨段鼻底鼻中隔面为四个面 唇粘骨膜瓣为底的水平四棱锥体 术中要仔细而充分地分离 使各个组织面均有一定松弛度 并使植骨床有足够的间隙 植足够的骨 要充分松弛各粘骨膜瓣 保证骨植入后粘骨膜瓣无张缝合

2.3.3 自体髂松质骨颗粒的获得 在髂前上棘上约 1 cm 沿皮纹方向横行切开皮肤 3 cm 皮下分离至髂棘 作工字切口 由肌层至骨髓腔将骨皮质向两侧翻开 显露骨松质及骨髓 根据植骨床大小挖出适量骨松质及骨髓 备用 将骨皮质及软组织复位 橡皮引流条 分层缝合 局部加压

2.3.4 植骨 将髂松质骨髓修剪成直径 0.2~0.3 cm 的颗粒 由里至外放入并同时加压 将骨颗粒与两侧骨壁紧密贴合 尽量使植入骨致密 适当填入犁状孔边缘 其植入量视健侧丰满度 可适当多植入

2.3.5 创面处理 严密缝合创面 使其粘骨膜瓣在无张力条件下完全覆盖植骨创面 牙龈乳头不作修整 松弛切口可不处理

收稿日期 001-07-17

作者简介 罗渝宁 1964- 男 1987 年毕业于四川大学华西口腔医学院 讲师 主治医师 电话 020-61641888-87149

3 结果

病人创口均一期愈合,无并发症。术后 3 月,区肿痛完全消失,上颌齿槽突连续完整,有一定高度及丰满度,口鼻瘘封闭,患侧鼻翼基底明显上抬,右侧基本对称。未行鼻畸形整复术。术后 6 月,外观与术后 3 月比无明显变化。线示骨愈合良好,有明显骨形成,骨密度同正常骨组织,两者之间无明显界限。

4 讨论

4.1 植骨术的依据

唇腭裂术后遗留的齿槽突裂及口鼻瘘势必给病人造成患侧齿槽突向腭侧移位,牙齿排列紊乱,邻近裂隙的牙扭转倾斜,口鼻瘘及牙列不齐,影响口腔卫生及发音,患侧鼻翼塌陷,牙弓不连续及牙萌出障碍等等,而造成这些畸形的机制主要是上颌骨齿槽突局部的骨缺失,邻近骨段及软组织缺乏骨性支持。单纯的软组织手术不能解决,只有恢复上颌骨齿槽突局部骨缺失的植骨术才能解决这一问题,并可为后期治疗创造条件。不同年龄组植骨的目的不同:11 岁,尖牙根形成 2/3 时,植骨可恢复上牙弓连续性,术后 6 月内尖牙有可能从植骨区正常萌出,同时修复口鼻瘘,矫正患侧鼻翼基底塌陷。而 13 岁以后尖牙根已基本形成,线示植骨的主要目的则是修补口鼻瘘,抬高患侧鼻翼基底,同时为后期正颌手术提供骨质保证。本组病人尖牙根已基本形成,植骨术的目的主要是后者,并达到了预期的效果。

4.2 植骨材料的选择

齿槽突裂植骨术最常用的植骨材料有自体髂松质骨,下颌颌部骨,颅骨等。也有人使用冻干骨,人工合成骨及复合骨等。实践证明,自体骨远优于异体骨,异种骨及人工骨。有学者认为膜内成骨移植骨,下颌骨及颅骨,较软骨内成骨的移植骨,髂骨,肋骨,具有更大的优越性,并列出了齿槽突裂植骨的选择顺序:颌颌部骨,颅骨,髂骨。但前两者骨量有限,并可能发生一些较严重的并发症:颞神经及下牙槽神经血管损伤,损伤牙龈,牙根及牙胚,损伤颅脑等。而髂松质骨髓颗粒供骨量丰富,成骨作用确实,抗感染力强,且新骨来自植入的松质骨髓颗粒表面的骨内膜骨母细胞,始终都有新骨再生。虽然植入骨被部分吸收,但有新骨替代,术后 7 周新生骨即与上颌齿槽突的组织学结构一致。另外,植入骨可按临床需

要塑形术中,将植入骨剪成细小颗粒,并用力填塞,使其尽量致密,同时植骨床周围软组织松弛,减小植骨区的张力,使其吸收率降至最低。本组病例均为发现植入骨体积减小和骨质疏松等表现。

4.3 注意事项

术前应进行各种常规检查,尤其是 X 线的局部检查,以明确植骨区情况,认真设计手术方案,做好各种准备,设计充足的粘骨膜瓣,使植骨区能在无张力的情况下被粘骨膜瓣完全而松弛的覆盖,严密关闭植骨创面,注意植骨床与鼻腔的关闭,防止伤口感染。术中除残根,牙及影响植骨的牙需要拔除外,其余牙均应保留,严防损伤牙根,牙胚。应注意上唇系带的位置,防止上唇偏斜。髂骨松质骨髓取出后应尽量减少暴露在体外的时间,尽快放入植骨床内,以免影响其成骨活性。抗生素从术前 1 d 开始预防性应用,术后维持 5~9 d。术后保持口腔卫生,定期复查,尤其在早期发现问题及时处理。

参考文献

1. Robertson NRE, Jolleys A. An 11-year follow-up of the effects of early bone grafting in infants born with complete clefts of the lip and palate. *Br J Plast Surg*, 1983, 36(4): 438-41.
2. 马莲蓉, 奕光, 唇腭裂的牙槽突裂植骨修复术. *中华整形烧伤外科杂志*, 1996, 12(2): 107-9.
3. Ma L, Luo Y, Wang GH. Correction of alveolar cleft by bone graft in the patients with cleft lip and palate. *Chin J Plast Surg Burns*, 1996, 12(2): 107-9.
4. 罗奕, 小勇, 刚, 马莲蓉. 骨移植术在修复腭裂牙槽突裂畸形中的应用. *中国口腔学杂志*, 1996, 31(4): 204-6.
5. Luo Y, Sun YG, Ma L, et al. Alveolar reconstruction in patients with cleft palate. *Chin J Stomatol*, 1996, 31(4): 204-6.
6. Wolfe SA, Berkowitz S. The use of cranial bone grafts in the closure of alveolar and anterior palatal clefts. *Plast Reconstr Surg*, 1983, 72(5): 659-61.
7. Koole R, Bosker H, van der Dussen FN. Late secondary autogenous bone grafting in cleft patients comparing mandibular (ectomesenchymal) and iliac crest (mesenchymal) grafts. *J Craniomaxillofac Surg*, 1989, 17(Suppl): 28-30.
8. 冯宗锦, 陈光, 陈松龄. 冷冻胚胎骨和羟基磷灰石复合植入整复上颌齿槽突裂. *临床口腔医学杂志*, 1995, 11(3): 164-6.
9. Ames JR, Ryan DE, Maki KA. The autogenous particulate cancellous bone marrow graft in alveolar clefts. A report of forty-one cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1981, 51(6): 588-91.
10. Mark RE, Miller RI, Ehler WJ, et al. A comparison of particulate allogeneic and particulate autogenous bone grafts into maxillary alveolar clefts in dogs. *Oral Maxillofac Surg*, 1984, 42(1): 3-9.

急诊床旁超声心动图在急性心肌梗死病人监护病房的临床应用价值

王 鹏¹袁武文²袁谢志斌¹袁曹世平¹渊第一军医大学南方医院心内科超声室袁广东 广州 510515白兰州乌鲁木齐总医院普内科袁新疆 乌鲁木齐 830000冤

摘要目的 探讨急诊床旁超声心动图(UCG)在急性心肌梗死病人监护病房(cardiac care unit,CCU)的临床应用价值遥方法 回顾性分析了2000年4月至2001年3月进行急诊床旁UCG检查的116例临床病例遥结果 急诊床旁UCG检查的阳性率100%遥本组116例中冠心病57例渊9%冤其中心肌梗死41例渊5.0%冤心绞痛16例渊4.0%冤高血压心脏病26例渊2.5%冤风湿性心脏病9例渊8%冤扩张型心肌病9例渊8%冤主动脉夹层瘤7例渊0%冤其他8例渊9%冤遥结论 急诊床旁UCG检查作为心脏急诊诊断的辅助手段袁无论在诊断阳性率方面袁还是在临床干预的结果方面袁均具有重要的临床应用价值遥

关键词院床旁超声心动图;心肌梗死;急性

中图分类号:R540.45 文献标识码:B 文章编号:1000-2588(2002)08-0762-02

Clinical value of emergency bedside ultrasonocardiogram in cardiac care unit

WANG Peng¹, WU Wen²袁XIE Zhi-bin¹, CAO Shi-ping¹

¹Department of Cardiology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China;

²Endocrinology Department, General Hospital of Urumqi, Urumqi 830000, China

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of application of emergency bedside ultrasound cardiogram (UCG) in cardiac intensive care unit. Methods We conducted a retrospective analysis of 116 cases who received examination with emergency bedside UCG within the period from April 2000 to March 2001. Results The positive rate of examination with emergency bedside UCG was 100% among these patients. The diseases identified were as follows: acute myocardial infarction in 41 cases, angina pectoris in 16, ventricular aneurysm in 5, perforation of ventricular septum in 2, rheumatic valvular disease in 9, dilated cardiomyopathy in 9 and aortic dissecting aneurysm in 7. Conclusion Emergency bedside UCG has important value in clinical diagnosis of cardiac emergencies.

Key words: bedside ultrasound cardiogram; acute myocardial infarction; cardiac care unit; UCG

随着现代医学诊疗技术的不断发展袁近年来急诊床旁UCG受到临床医生的普遍重视袁已成为协助CCU病室心脏急症诊断和治疗结果评价的重要措施之一遥现将我院CCU病房一年来的急诊床旁UCG检查结果报告如下遥

1 资料与方法

1.1 临床资料

病例选择2000年4月到2001年3月我院心内科CCU病房116例行急诊床旁UCG检查的住院患者袁其中男性85例袁女性31例袁年龄最小13岁袁最大84岁袁平均59.3岁遥

1.2 设备

采用的机器为SEQUOIA512超声显像仪袁探头频率3.5 MHz遥

1.3 方法

急诊UCG是应CCU病房医生电话或申请单相邀袁即将机器迅速推至床旁袁按超声常规切面进行检查袁检查在不妨碍临床治疗或抢救的情况下实施袁并进行时录像袁以便资料保存袁会诊及出具报告单遥检查时多邀临床医生共同参加袁获得的心脏结构及功能信息及时反馈给临床医师袁有效指导临

床采取相应急救措施遥

2 结果

本组116例患者中急诊床旁UCG诊断阳性率为100%袁这与CCU病房所住病人多系危重患者有关遥从年龄上看袁6岁以上老年人占62%渊2/116冤袁从性别上看袁男性明显高于女性袁占73%渊5/116冤遥从疾病分类方面看袁冠心病仍是急诊床旁UCG检查的主要适应证之一遥本组116例中袁首位是冠心病渊9%冤袁7/116袁其次是高血压心脏病渊2.6%冤袁6/116袁第三位是扩张心脏病和风湿性心脏病渊9例袁8%冤袁1/116袁第四位是主动脉夹层瘤渊7例袁1/116冤袁其他8例渊9%冤袁1/116袁

3 讨论

3.1 急诊床旁UCG的主要特点

一是起病急袁要求检查设备尽快到位袁并迅速做出诊断曰二是操作难袁患者体位及室内光线干扰袁获取高质量图像难度相对增加曰三是要求高袁检查者必须具备一定的临床基础袁熟悉临床急症处理常规袁能够快速准确诊断曰四是反馈快袁邀临床医生同时参与袁检查结果可以当即提供临床遥

3.2 急诊床旁UCG的价值

急诊床旁UCG检查具有机动性强袁准确性高袁心脏结构和功能信息获得的无创性等优点遥它不干扰抢救过程袁甚至可以直

收稿日期:2002-01-20

作者简介:王 鹏渊965年袁新疆库尔勒人袁995年毕业于第二军医大学袁本科袁主管技师袁电话020-85141888-87093

接指导医疗干预和评估预后结果等已成为心脏急症确立诊断最有效的措施之一。采用急诊床旁 UCG116 例患者均得到了及时有效的治疗。

急诊床旁 UCG 检查由于其能迅速为临床提供有价值的资料特别是心脏急症而且投资少易于推广在临床价值方面都有着广阔的发展前景。

参考文献:

- 咄暂 郇朝辉 杨浣宜. 急诊床旁 UCG 在临床应用的价值. 中国超声医学杂志, 1999, 15(12): 911-3.
- Gao ZH, Yang HY. Experience of echocardiography in bedside application for emergent patients. Chin J Ultr Med, 1999, 15(12): 911-3.

支气管异物的外科治疗

Surgical treatment of aspiration of foreign body in the bronchus

朱平 第一军医大学珠江医院胸心外科 广东 广州 510282 冤

关键词 异物 支气管

中图分类号 562 文献标识码 院 文章编号 000-2588(2002)08-0763-01

支气管异物多见于儿童, 常见有异物病史及出现相应呼吸道症状, 但部分患儿因病程较长, 未能提供明确异物史, 给临床诊治带来困难。现就 3 例支气管异物的诊断和治疗进行讨论, 以供借鉴。

1 临床资料

病例 1 男, 3 岁, 反复咳嗽 10 个月, 低热 5 个月, 外院抗结核治疗 4 个月, 复查体弱, 精神萎靡, 右胸廓稍塌陷, 右肺呼吸音减弱, 可闻及湿罗音, 胸片示右心缘膈上均匀玻璃样致密阴影, 从隔向右侧移位, 侧位中叶阴影与心影重叠, 纤维支气管镜检查, 右支气管开口呈瘢痕样狭窄, 管腔几乎完全闭塞。追问病史, 患儿诉 1 年前曾误吸一气球塑料口哨, 未能咳出。胸部 CT 示右肺中间支气管狭窄, 管腔内可见一短条形高密度阴影, 诊断为右支气管异物, 决定手术治疗。术中见右中支气管呈暗红色, 质地脆硬, 以猪肝样, 不能随呼吸起伏运动, 右支气管处可扪及一硬质圆柱状异物, 周围组织炎性水肿, 异物处气管前后各有一约 2.5 cm 伊 0.5 cm 伊 0.5 cm 大小的淋巴结, 右中支气管肺叶内充满脓性分泌物, 行右中支气管切除, 淋巴结摘除, 取出异物。

病例 2 女, 4 岁, 咳嗽, 气促 3 d, 以急性支气管炎入院, 查体院口唇轻度发绀, 气性呼吸困难, 呼吸音粗, 闻痰鸣音, 哮鸣音, 用抗菌素治疗, 肺部症状不见好转, 次日咳嗽, 气促加重, 发绀明显, 右肺呼吸音消失, 胸片见右肺野内有一柱状阴影, 遂复洗头天胸片, 见阴影已经存在, 诊断支气管异物, 请耳鼻喉科会诊, 置硬质气管镜, 见一金属异物位于右主支气管内, 因太光滑, 反复钳取不出, 相反向右主支气管远侧移位, 决定手术治疗。术中见右中支气管肺叶不张, 在中间段支气管内

扪及一柱状异物, 气管膜部作横切口, 取出异物, 膨肺, 中下肺叶复张。

病例 3 男, 1 岁, 因误吸气球塑料口哨 7 d, 咳嗽, 气促, 哮喘来院就诊, 查体院气性呼吸困难, 双侧呼吸运动对称, 右肺可闻痰鸣音, 哮鸣音, 左叶呼吸音明显减弱, 胸片见右下肺叶不张, 置硬质气管镜检查, 异物在右下肺叶支气管开口处, 予以取出, 但口哨内塑料薄片未能寻见, 咳嗽, 哮喘, 呼吸困难症状明显改善, 出院, 出院 2 周后, 自行咳出白色塑料薄片, 而痊愈。

2 讨论

气管异物在儿童中发生率较高, 多早期发现, 及时取出, 而痊愈, 但由于婴幼儿不能提供呛入异物病史, 少年儿童惧怕家长责怪, 故意隐瞒病史, 给诊断带来困难, 而延误治疗。病例 2 因咳嗽, 哮喘, 入院, 误吸异物, 肺炎, 治疗入院, 因无异物呛入病史, 尽管当时肺野内有异常阴影, 疑为体外异物, 而疏忽, 疗效不明显, 使症状加重, 复查两次胸片, 均见肺野内有阴影, 可能是气管内异物。病例 1 则因隐瞒呛入异物病史, 反复肺部感染, 近 1 年, 肺部实变, 最终行肺叶切除, 其教训极其深刻。对气管内异物, 因婴幼儿不能自述, 少年儿童不敢说明的, 一定要高度警惕, 对有呼吸道症状的儿童, 应仔细诱导患儿询问有无异物吸入史, 首先排除气管异物的可能, 然后再予以其他治疗, 以免延误诊治。

对支气管异物的治疗, 应尽量通过支气管镜将异物取出, 失败再行外科手术。在决定手术前, 应常规行胸部 X 线检查, 了解异物移位情况, 手术取异物, 应尽量争取通过切开支气管完成, 对明确支气管异物部位, 窥镜钳取失败, 异物去除后, 肺能复张的, 在异物上方气管膜部作一小横切口, 能顺利取出异物, 对异物在体内存留时间较长, 导致反复肺部感染, 肺部脓肿形成或肺实变的, 失去肺功能的病肺, 应予切除。

收稿日期 002-03-18

作者简介 朱平 (1955-) 男, 江苏兴化人, 1991 年毕业于第四军医大学, 现为珠江医院胸心外科副主任, 电话 20-61642975

卵巢癌脾脏转移 1 例报告

Ovarian carcinoma metastatic to the spleen: report of one case

刘国炳袁张广亮袁鄢福祺渊第一军医大学南方医院妇产科袁广东 广州 510515冤

关键词 卵巢癌 脾脏 转移

中图分类号 院 714.22 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588(2002)08-0764-01

卵巢癌的转移以腹腔壁腹膜及腹腔脏器的浆膜直接种植转移及局部扩散为主袁主要是接触性浸润和直接蔓延袁其次为淋巴引流扩散袁血行播散极为少见遥肝脾肺实质内转移仅见于个别较晚期病例遥本文报道 1 例卵巢浆液性囊腺癌脾脏转移诊治情况遥

1 临床资料

患者女袁6 岁袁000 年 5 月 10 日住院袁因全子宫加双附件切除术后 1 年余发现盆腔包块 3 月入院遥1998 年 11 月因双侧卵巢肿瘤冶于当地医院行全子宫加双附件切除术袁手术顺利袁切口愈合佳袁未做病理检查及其他治疗遥半年前无诱因出现下腹坠痛袁持续性袁放射痛袁到当地医院就诊诊断为盆腔炎症袁给予消炎治疗好转遥 个月前自感肛门下坠感袁排尿困难袁每次排尿需约 30 min 袁尿急尿痛遥在当地 B 检查超声显示盆腔包块袁包块大小约 9.2cm 伊 5.5cm 袁服中药治疗 1 个月未见好转袁包块无缩小遥无咳嗽尧恶心尧呕吐尧腹泻等症状遥000 年 5 月 10 日来我院检查袁以盆腔包块冶收入院遥月经 5 岁初潮袁经期 5~6 d 袁周期为 30 d 袁末次月经为 1998 年 11 月 20 日遥妊娠 5 次 院自然产 2 次袁人工流产 1 次袁剖宫产 2 次遥体温 36.8 袁脉搏 80 次/min 袁呼吸 19 次/min 袁血压 90/60 mmHg 遥头颈五官未见异常袁心肺未闻及异常袁腹正中可见一约 12cm 切口疤痕遥妇科检查 院外阴经产式 院阴道通畅袁端光滑袁盆腔偏左可及一约 13cm 伊 2cm 伊 0cm 大小的囊实性包块袁表面欠光滑袁活动固定袁边界欠清袁无压痛遥CT 扫描 院盆腔内巨大囊性占位性病变 0cm 伊 2cm 冤囊腺癌可能性大 院肝胆胰未见异常脾内低密度灶及脾门结节状影袁考虑为转移瘤遥盆腔 B 超 院脾实质内见 12.6cm 伊 1.1cm 尧边界欠清尧囊壁不光滑尧内有密集细小光点尧低回声隆起的分隔光带袁提示盆腔囊性占位性病变遥腹部 B 超 院脾实质内见 47mm 伊 0mm 及 39mm 伊 5mm 两个不均质回声区袁脾门处见 19mm 伊 6mm 弱回声实性占位袁提示脾实质性占位及脾门淋巴结肿大 院肝胆胰双肾未见异常遥癌胚抗原 125 渊A125冤 162.7U/ml 袁组织多肽抗原 渊PA冤 2.12

滋/m 袁组织多肽特异性抗原 渊PS冤 165.2U/L 遥血沉 90 mmH₂O 遥甲胎蛋白 渊AFP冤 9.9 滋/L 遥心电图正常 袁胸片心肺未见异常 遥大小便正常 遥A 型血型 袁常规正常 遥于 2000 年 5 月 29 日在硬膜外加腰麻下手术袁术中探查子宫直肠窝处有一约 13cm 伊 0cm 伊 1cm 大小的包块袁固定袁浸润至盆壁尧膀胱尧结肠尧直肠壁浆膜层袁盆壁淋巴未触及 袁肝胆未触及 袁异常袁结肠处大网膜见一约 4cm 伊 cm 大小的质硬结节袁脾脏增大 约 12cm 伊 0cm 袁表面灰白色 袁近脾门实质处有一不规则隆起 袁约 7cm 伊 cm 伊 cm 大小 袁脾门淋巴结肿大 遥行盆腔内占位性病变切除尧大网膜切除及脾脏切除遥腹腔冲洗液未见癌细胞袁可见淋巴细胞尧红细胞及少量中性粒细胞遥术中卡铂 500mg 加 500ml15% 葡萄糖及 500ml 低分子右旋糖酐中灌入腹腔遥术后病理 院卵巢浆液性囊腺癌伴脾脏尧大网膜转移遥术后 11d 痊愈出院遥现正处于随访中遥

2 讨论

卵巢癌脾脏转移很少见袁国内外仅有个案或小样本报道遥本文报道的患者可能是在卵巢癌玉期行子宫加双附件切除术后 1 年半袁没有采取其他任何治疗措施袁而出现脾脏转移的遥这么短期内出现脾脏转移袁文献中未见报道遥 Gemignani 等^[1]报道 6 个芋期卵巢癌经过肿瘤细胞减灭术后并用铂类药物腹腔化疗袁 CT 检查证实有脾脏转移袁而在第一次手术后的 28~88 个月 渊中位数 59 个月冤进行脾脏切除袁并认为脾脏转移可能发生在上皮性卵巢癌的晚期复发袁脾脏切除是晚期复发性卵巢癌治疗的一个部分遥 Spencer 等^[2]认为上皮性卵巢癌脏地脏转移率较以前高袁且脏地脏脾内损害的转移比表面损害的转移治疗反应差袁也是卵巢癌复发的特征袁并指出脾脏实质转移的存在是卵巢癌郁期的证据遥

参考文献

- 1 Gemignani ML, Chi DS, Gurin CC, et al. Splenectomy in recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 1999, 72(3):407-10.
- 2 Spencer NJ, Spencer JA, Perren TJ, et al. CT appearance and prognostic significance of splenic metastasis in ovarian cancer. *Clin Radiol*, 1998, 53(6):417-21.

收稿日期 院 002-01-23

作者简介 院刘国炳 渊960-冤男袁安徽肥东人袁1985 年毕业于第一军医大学袁本科 院副主任医师 院副教授 院电话 院 20-61641888-87290

松果体区垂体嫌色细胞腺瘤 1 例报告

A pituitary chromophobe adenoma in the pineal region: report of one case

冯文峰 袁松涛 袁彬 林袁炳辉 (第一军医大学南方医院神经外科 广东 广州 510515)

关键词 松果体区 垂体腺瘤

中图分类号 R739.41 文献标识码 B 文章编号 000-2588(2002)08-0765-01

1 临床资料

患者男 8 岁 遥因头晕 尧头痛 5 月 尧症状加重 3 个月 入院 遥入院时主要表现为头晕 尧头痛 尧痛位于枕部及双颞部 尧阵发性 尧痛 尧无放射 尧无恶心 尧吐 尧无视力障碍 尧发育迟缓及早熟等 遥入院查发育正常 尧营养中等 尧自动体位 尧若语流利 尧对答切题 尧心肺腹部检查无异常 尧生殖器呈成人型 尧神经系统检查无阳性体征 尧发现 尧双眼上视障碍 尧头颅 MRI 检查示 尧重度脑积水 尧第三脑室后部松果体区一囊性占位性病变 尧大小约 1.5cm伊cm伊cm 尧 尧像见病变囊壁呈稍低信号 尧囊内组织为较低信号 尧较脑脊液信号稍高 尧增强扫描见病变囊壁表面明

显强化 尧而囊壁内层及囊内组织无强化 (图 1) 遥入院后经枕部小脑幕入路 尧open 入路 尧行手术治疗 尧切除肿瘤 尧术中见肿瘤为囊性 尧囊壁呈灰白色 尧穿刺抽出黄色囊液约 3 ml 尧囊壁与周围结构有明显边界 尧血供较丰富 尧完整剥除囊壁 尧脑脊液自第三脑室流出 尧并可见三脑室室管膜 尧中脑及中脑导水管 尧尧脑大静脉 尧尧脑内静脉保护完好 尧剥除之囊壁送检病理 尧镜下所见瘤细胞形态较一致 尧圆形 尧与淋巴细胞相似 尧在核外有少量胞浆 尧瘤细胞为嫌色性 尧遥病理诊断为垂体嫌色细胞腺瘤 尧术后复查 MRI 肿瘤全切除 (图 2) 尧患者痊愈出院 遥



图 1 术前 MRI 图



图 2 术后 MRI 图

2 讨论

松果体肿瘤包括发生于松果体实质的肿瘤及发生于松果体临近结构的肿瘤 遥松果体实质细胞的肿瘤包括松果体细胞瘤和松果体母细胞瘤 尧很少见 尧发生于松果体临近结构的肿瘤较多见 尧其发病率为 0.4%~1% 尧儿童达 3%~8% 尧多为生殖细胞瘤和非典型畸胎瘤 尧另外胶质瘤 尧膜瘤 尧胆汗瘤 尧样囊肿等亦多有报道 尧遥经光盘检索国内外文献未见松果体区垂体瘤报道 遥垂体瘤是发生于脑垂体上的腺瘤 尧位于鞍区 遥异位垂体瘤较少见 尧主要位于蝶窦或鼻腔之中 尧 Villani 尧介绍 1 例位

于三脑室内 尧三脑室前部 尧的垂体瘤 尧位于松果体区者 遥

从发生学观点看 尧松果体区各细胞主要由内胚层发育而来 尧而垂体由外胚层发育而成 尧因此 尧松果体区垂体腺瘤的发生原因尚不明确 尧有待进一步研究阐明 遥松果体区异位垂体腺瘤属良性病变 尧手术治疗全切除病变并打通脑脊液循环是治疗方法的最佳选择 遥

参考文献

咱暂王忠诚. 神经外科学 咱暂武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 441-3.
咱暂 Villani R, Papagno C, Tomei G, et al. Transcallosal approach to tumor of the third ventricle. Surgical results and neuropsychological evaluation 咱暂 J Neurosurg Sci, 1997, 41: 41-50.

收稿日期 002-01-17

作者简介 冯文峰 渊967- 袁男 袁湖南岳阳人 袁990 年毕业于第一军医大学 袁主治医师 尧讲师 尧电话 院20-61641810 尧e-mail: sjwk@fimmu.com

医学科技论文野结果渊部分图表有关内容的英文表达

王征爱袁建武渊第一军医大学学报编辑部袁广东 广州 510515冤

摘要渊要论述医学科技论文野结果渊部分图表的英文表达方式和要注意的问题袁并举例加以说明供广大医学科技人员参考。

关键词 医学科技论文 图表 英文表达

中图分类号 院633.34:R-05 文献标识码 院 文章编号 院000-2588(2002)08-0766-03

English representation of tables and figure legends in the section of Results in medical papers

WANG Zheng-ai, SONG Jian-wu

Editorial Office of J First Mil Med Univ, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: In this article, the author provides a sketchy description of English representation of the tables and figure legends mostly seen in the Results section of a medical paper, with some examples which might be helpful for potential medical journal contributors.

Key words: medical papers; tables; figures; English expression

图和表是医学论文野结果渊部分的重要表达方式袁设计合理尧使用得当的图表有时可以节省大量文字说明袁而且会起到文字说明无法达到的效果遥在编辑过程中袁我们发现不少作者对图表的使用及其中相关内容的英文表达尚缺乏深刻的认识袁所以本文就此进行简要论述遥

1 表

凡表都应有表题和序号渊ab 1尧ab 2...袁有的杂志如本学报及 J Med Coll PLA 要求即使全篇只有一个表袁也应标示序号 Tab 1)袁置于表的上方遥

表格应有自明性袁即无需借助正文就能很清楚地知道表格所要表达的内容遥表格的使用也不是随心所欲的遥表宜少而精袁用少量文字能交待清楚的则不用表遥从数量上讲袁每千字正文包含的表格不可多于一个袁而且对于可以用简练的文字加以说明的内容袁不宜用表格表达渊有时是为了便于编辑排版袁表格的数量要严格控制冤另一方面袁某些内容虽然可用表格来表达袁但可能并非最佳手段遥比如袁若要说明某类病人在治疗过程中体温的变化时袁表格固然可以达到目的袁但其效果就远不如用曲线图直观了遥用表格说明几个指标的对比袁有时也会不如直方图醒目遥由此可以看出袁结果部分的表达是比较灵活的袁表格尧曲线图尧直方图或其他任何有效的说明方式都可以使用遥值得注意的是袁表格大多使用三线表渊和本文的几个例子冤而曲线图尧直方图应美观清楚袁但不应有过多装饰成分渊尤其是电脑制图的广泛使用后袁某些作者过分的讲求美感渊而忽略了医学科技论文的一般风格冤直白简明就好遥

表题要简明袁一般以不超过两行为宜袁表题末不用标点符号遥表题尧表中栏目和表注中英文首词之首字母应大写袁其余为小写袁以免项目间发生混淆遥表的各栏参量都应标注单位袁若所有栏的单位相同袁可将单位标在表题末渊表 1冤不同的单位标注在有关栏内遥表内数目一律用阿拉伯数字袁同一项目保留小数的位数应一致袁上下行位数应对齐袁一般以小数点或野冶野冶野冶野冶等符号为准遥表内数据必须与正文相符袁且切忌重复过多遥表内尽量不留空白袁可用野冶代表未测或无此项袁野冶代表实测结果为零遥相邻栏内的数字或内容即使相同袁也要照写袁不能用任何表示相同的符号代替遥表内不设野注渊袁说明性文字应置于表注而不放在标题里遥如表中某一数据袁或其他情况需注释时袁可在右上角标以注符或尧尧等袁在表下方依次解释说明遥对某一数据渊P 值冤说明其统计学意义时袁可在其右上角标注*号尧尧尧数字序号或其他符号袁在表下加以说明袁如*P<0.05袁#P<0.01 以及与其相比较的组别袁如表 1遥

Tab.1 Effect of pethidine on increased tracheal vascular permeability induced by hot air injury in rats (n=10, Mean 依D)

Group	Evans blue content (mg/dry weight)		
	1 h	2 h	3 h
Control	0.24 依 0.10	0.25 依 0.11	0.25 依 0.10
Injury	0.38 依 0.11	0.59 依 0.11	0.66 依 0.13
Pethidine	0.29 依 0.07*	0.37 依 0.14**	0.50 依 0.12**

P<0.05, P<0.01 compared with the control group

*P<0.05, ** P<0.01 compared with the injury group

要注意的是袁要表达野与某组比较 P 小于或大于

某一数值的意思时，英语语序恰跟汉语相反。如上例表 1 中 $P < 0.01$ compared with the control group 若写成中文则是与对照组相比 $P < 0.01$ 。许多作者甚至编辑都把它写成 $P < 0.01$ compared with (the) control group, $P < 0.01$ 。这种表达不符合一般习惯。另外，compared with 可简化成 vs (vs 是外来语的简写故需用斜体)。表 1 换言之，可用 vs 取代 compared with。如 $P < 0.01$ compared with the injury group 可写成 $P < 0.01$ vs the injury group。除此，与... 比较还可使用词组 in comparison with 表示，但遵循从简原则，不提倡多用。

Tab.2 Antigen-specificity of GBP-iRNA (n=5, Mean \pm SD)

Antigen group	MTT-LAI	
	Control	Experimental
GBP	-1.55 \pm 0.38	15.74 \pm 0.56*
M-Ag	-0.96 \pm 0.57	13.32 \pm 0.80*
R-Ag	3.92 \pm 0.41	4.59 \pm 0.78

* $P < 0.05$ vs control

对于过长的项目词，可以采用其缩写形式，但须在表下注明。在正文中出现过的，表下可不再加注。表 3 如例 3。

Tab.3 Serum MDA level in the rats (nmol/ml, Mean \pm SD)

Group	1h before IR	1h after IR	4h after IR	12h after IR
Control	1.22 \pm 0.12	1.24 \pm 0.18	1.23 \pm 0.13	1.24 \pm 0.15
IR	1.23 \pm 0.14	5.14 \pm 0.31	9.27 \pm 0.72	12.38 \pm 0.03
HP+IR	1.07 \pm 0.28	4.02 \pm 0.44	7.24 \pm 0.62	9.02 \pm 0.46

IR: Ischemia reperfusion group; HP+IR: Heat stimulated pretreatment+IR group; MDA: Malondialdehyde

Tab.4 Comparison of Results for Two Different Methods of PDG Placement

Method	n	Success rate (%)	Complication rate		Mortality rate (%)	Mean procedure time (min)
			Major (%)	Minor (%)		
Push-wire (present study group)	118	96	4.4	12.4	0.8	18
Pull-string						
Ponsky et al ²	306	100	5.9*		0.3	not stated
Larson et al ²	314	95	3.0	13.4	0.4	10

*Reported antototal morbidity (major and minor)

总之，整个表一定要做到完全不参考正文便能理解其内容。标题与各栏头内可以使用缩略语，但要与正文取得一致。正文没有的，请在表下加注，写出其全称。

这里要指出的是，表中常见的错误是标目名词用了复数。用单数是因为这里表达的不是数的概念。以 Group 为例，表 1 中它的含义不是指组数，而是组别。或野组。标目下每一行相当于一个句子。

中文版杂志表题要求双语表示。统计学符号也宜区别对待。均数加减标准差 $\bar{x} \pm s$ 依 M \pm SD 或 Mean \pm SD 表平均数加减标准误 $\bar{x} \pm \bar{s}$ 依 M \pm SE 表中缩写词哪怕是在正文中出现过的，表下仍应再加注释。因为英文图表主要考虑适应国外读者。文中缩写的对应词是汉语。外国人看不懂，起不到交流或宣传作用。

若表 2 以后的缩写跟表 1 相同，不要重复标注。但要这样告诉读者：

The abbreviation(s) is/are the same as that/those in Tab.1

On the meaning of abbreviation(s), see Tab.1

For abbreviations (please) refer to Tab.1

See Tab.1 for specification of the abbreviations

The abbreviations are specified in Tab.1

常见表下注示例院

Results are expressed as Mean \pm SD;

* Significantly different from controls;

$P < 0.01$, (as) compared with controls;

*The values represent the mean (SD) number of ingested yeast cells per monocyte;

Data are given as the mean number of monocytes per high power field \pm standard deviation;

Figures (数字) are means \pm SE unless otherwise stated; + Fisher's exact test; # Sign test.

表中也可引用参考文献，如表 4 院

的只是这一组的情况怎么样。如对照组 (Control) 治疗组 (Therapy) 5 岁年龄组 (3-5 years old) 但也有用复数的。如 MVT fatalities (车祸死亡人数)。这种表的项目栏中每个栏目下都有两个次栏目。male, female 复数概念很明显。再就是括号内用名词复数如 age (years), 不难理解 age 一词在这里无复数概念。而 year 的数的概念则显而易见。如表 5 院

Tab.5 (表题因文字较多略)

美国医学索引2001年收录中国期刊名单

中国高等学校自然科学学报研究会对外联络委员会

亚洲太平洋公共卫生杂志(英文版)	生理学报	中华耳鼻喉科杂志
亚洲男性学杂志(英文版)	生物工程学报	中华妇产科杂志
细胞研究	生物化学与生物物理学报	中华肝病杂志
中华创伤杂志	生物医学工程学杂志	中华结核和呼吸杂志
中华医学杂志(英文版)	实验生物学报	中华口腔医学杂志
中国医学科学杂志(英文版)	卫生研究	中华流行病学杂志
中华眼科杂志	世界胃肠病学杂志(英文版)	中华内科杂志
法医学杂志	微生物学报	中华烧伤杂志
光谱学与光谱分析	眼科学报	中华实验和临床病毒学杂志
香港医学杂志(英文版)	药科学报	中华外科杂志
环境科学	遗传学报	中华血液学杂志
华西口腔医学杂志	应用生态学报	中华眼科杂志
华西医科大学学报	中国寄生虫学与寄生虫病杂志	中华医学遗传学杂志
湖南医科大学学报	中国修复重建外科杂志	中华医学杂志
同济医科大学学报(英文版)	中国医疗器械杂志	中华预防医学杂志
中医杂志(英文版)	中国应用生理生理学杂志	中华整形烧伤外科杂志
临床耳鼻喉科杂志	中国医学科学院学报	中华肿瘤杂志
中国科学院 辑(英文版)	中国中西医结合杂志	中药材
色谱	中国中药杂志	*第一军医大学学报
生理科学进展	中华病理学杂志	

由朱 诚 渊16024 大连理工大学图书馆国际期刊咨询室田-mail:zhucheng@dlut.edu.cn 摘译自 ListofJournalsIndex, IndexMedicus, 2001, No.1 遥

* 第一军医大学学报由本会向 IndexMedicus/NLM 推荐遥2002-06 正式通知接受遥 本表未包括台湾期刊遥

敬告订户

本刊由广州花山印刷厂承印如有印刷和装帧质量不合格者
直接寄回编辑部或厂家更换

地址 广东省广州市花山印刷厂
邮编 510880 电话 020-86848567

第一军医大学学报

2002年8月 第22卷第8期

月刊 1981年创刊

主 办 第一军医大学
编 辑 出版 第一军医大学学报编辑部
潮州市 510515 免

电 话 020-86848175

传 真 020-86848176

电 子 信 箱 xbbjb@fimmu.edu.cn

主 编 李 康

常 务 副 主 编 王征爱

印 刷 花山印刷厂

发 行 广东省报刊发行局

国 内 定 购 全国各地邮局

国 外 定 购 中国出版对外贸易总公司
潮北京 782 信箱免

国内统一刊号 CN44-1152/R

邮 发 代 号 46-10

国 内 定 价 8.00 元

出 版 日 期 2002年8月20日

广 告 许 可 证 穗临广审字 0000 免 第 169 号

First Military Medical University

August 2002, Volume 22, Issue 8

Monthly, Started in 1981

First Military Medical University

Editorial Department of Journal of First
Military Medical University

020-86848175

020-86848176

xbbjb@fimmu.edu.cn

LI Kang

WANG Zheng-ai

Iuashan Printing Factory

免

Domestic: Local Post Offices

Foreign: China National Publications Export Trading
Corporation (P.O. Box. 782, Beijing, China)

CN44-1152/R

免 6-10

免 5.00

免 20 Aug., 2002

免