文章编号:1000-5404(2006)07-0621-05

论著

p65结合肽与p65的亲和力检测及其对NF-κB DNA结合活性抑制作用的鉴定

徐 祥[1],梁华平[1],郑 江[2],吴 强[1],刘东擘[1],史海水[1],胡湘南[3],王正国[1],朱佩芳[1] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042,[2]西南医院中心实验室,重庆 400038;[3]重庆医科大学药物化学教研室,重庆 400046)

提 要:目的 检测NF-κB p65亚基结合肽与p65间相互作用的亲和常数,以及其对NF-κB DNA结合活性的抑制效应。**方法** 借助于生物传感器技术分析NF-κB p65亚基结合肽与p65相互作用的动力学,同时应用竞争性ELISA鉴定结合多肽对NF-κB DNA结合活性的抑制效应。**结果** 生物传感器技术分析结果表明5条p65结合肽均能与p65发生相互作用,相互作用的亲和常数分别为GST-BPT1:2.67×10^{-7} mol/L、GST-BPT2:9.02×10^{-6} mol/L、GST-BPT3:1.07×10^{-6} mol/L、GST-BPT4:8.03×10^{-6} mol/L、GST-BPT5:9.83×10^{-7} mol/L。竞争性ELISA检测结果表明5条p65结合肽均能在一定程度上抑制NF-κB与其顺式作用元件κB基序的结合,且这种抑制效应随多肽浓度的增加而增强。**结论** 酵母双杂交筛选获得的5条p65结合多肽与p65间确实存在相互作用,且5条结合肽对NF-κB DNA结合活性均有一定的抑制效应,由此提示以这些多肽为先导物设计和开发靶向NF-κB的抗炎多肽药物将成为可能。

关键词: NF-κB;p65;生物传感器;多肽
中图法分类号: Q503;Q51;Q58 **文献标识码:** A

Determination of affinities of oligopeptides binding with p65 and identification of their inhibiting effect on DNA binding activity of NF-κB

XU Xiang[1], LIANG Hua-ping[1], ZHENG Jiang[2], WU Qiang[1], LIU Dong-bo[1], SHI Hai-shui[1], HU Xiang-nan[3], WANG Zheng-guo[1], ZHU Pei-fang[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Chongqing 400042, [2]Central Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [3]Research Laboratory of Pharmaceutical Chemistry and Biomaterials, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400046, China)

Abstract: Objective To determine the affinities of five oligopeptides specifically binding with DNA binding domain of NF-κB p65 subunit and identify their inhibiting effect on DNA binding activity of NF-κB. **Methods** By using biosensor the affinities were measured by means of kinetic analysis, and the inhibiting effects were determined by competitive ELISA. **Results** The results of biosensor showed that all of five oligopeptides really possessed the capability of specific interacting with NF-κB p65 subunit. The affinity constants of these oligopeptides were 2.67×10^{-7} mol/L, 9.02×10^{-6} mol/L, 1.07×10^{-6} mol/L, 8.03×10^{-6} mol/L, 9.83×10^{-7} mol/L respectively. The results of competitive ELISA indicated that five oligopeptides could inhibit NF-κB from binding with κB motif, and their inhibiting effect depended on their concentration. **Conclusion** Five oligopeptides that were screened by yeast two-hybrid system method can really interact with p65, and possess the inhibiting effect on DNA binding activity of NF-κB. So it will be possible that these oligopeptides are regarded as model to design and develop novel anti-inflammatory peptide drug targeting NF-κB.

Key words: NF-κB; p65; biosensor; oligopeptide

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054203);国家自然科学基金资助项目(30080009;30200270);全军医学科研"十五"计划面上项目(01MB113)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Project, G1999054203), the National Natural Science Foundation of China (30080009, 30200270) and the "Tenth Five-Year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (01MB113)

作者简介: 徐 祥(1972-),男,云南省昆明市人,博士,助理研究员,主要从事创伤后感染免疫方面的研究。电话:(023)68757431,E-mail: xxpxy@hotmail.com
通讯作者: 梁华平,电话:(023)68757964

收稿日期: 2005-04-25;**修回日期:** 2005-10-30

核因子-κB(NF-κB)是一种普遍存在的转录因子,是多种信号转导途径的汇聚点,不仅参与介导了免疫应答、病毒复制、细胞凋亡和增殖的多种基因的表达调控,而且在调节炎症反应的基因中起关键作用[1,2]。目前认为各种急慢性炎性疾病的发病机制和致病过程均与 NF-κB 的过度活化密切相关[3,4]。为此,许多学者最近提出 NF-κB 是极具潜力的新型抗炎靶点[3,4]。从理论上讲,如能有效拮抗 NF-κB 的活化,则可达到抗炎效果。

目前针对 NF-κB 拮抗策略有多种,但这些措施均存在特异性欠佳,毒副作用较大的问题[5-7]。从 NF-κB 的整个活化途径不难看出,NF-κB 与 DNA 顺式元件的结合是特异的,也是 NF-κB 启动相关炎症介质基因转录的必经之路。但目前针对 NF-κB 与 DNA 顺式元件结合设计肽类药物国内外少见报道。从理论上讲,如能特异阻断 NF-κB 与其顺式作用元件 κB 序列的结合,则可特异地抑制 NF-κB 的转录活性及其介导的基因的表达。为此本研究小组以人 NF-κB p65 亚基 DNA 结合域(p65BD)为靶蛋白,利用酵母双杂交技术自 16 肽的随机肽库中筛选到 5 条与其发生特异性相互作用的多肽[8]。为进一步分析结合肽与 NF-κB 相互作用的动力学,以及其对 NF-κB DNA 结合活性的抑制效应,本实验拟应用生物传感器和竞争性 ELISA 分析结合肽的结合动力学以及对 NF-κB DNA 结合活性的抑制作用,这将为靶向 NF-κB 抗炎多肽药物的开发和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

IAsys plus 生物传感器为 Affinity System 公司产品;羧甲基葡聚糖(Carboxymethyl Dextran,CMD)生物传感片、1-乙基-3-(3-二甲基-氨丙基)碳二亚胺(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)均购自 Thermo 公司;Mercury™ Transfactor p65 kits 购自美国 Clontech 公司,p65 标准蛋白购自美国 Active Motif 公司。

1.2 方法

1.2.1 羧甲基葡聚糖生物传感片的包被原理及包被过程 羧甲基葡聚糖生物传感片为一个表面包被有羧甲基葡聚糖的亲水小池,其表面的羧甲基群可与蛋白质氨基端的氨基发生耦联。反应过程为:首先用 EDC/NHS 活化羧甲基葡聚糖,形成 CMD/NHS 化合物,后加入需要包被的靶蛋白,CMD 的羧甲基通过静电方式吸附靶蛋白,靶蛋白的氨基与 CMD 的羧基通过酰胺羧基化将 CMD 上的 NHS 替换成靶蛋白。

p65 靶蛋白包被的具体过程如下:将羧甲基葡聚糖生物传感片装入 IAsys Plus 系统微射流卡盘,用 60 μl PBS/T[pH 7.4 PBS,0.05%(体积分数)吐温 20]冲洗 3 次,平衡 10 min,待基线走平后采集基线数据 5 min;将 EDC 和 NHS 按 1∶1 比例混合,取 40 μl 混合液冲洗样品池 2 次,后再在样品池中加入 40 μl混合液,保留 7 min 以激活传感片表面;用 50 μl PBS/T 冲洗样品池 3 次采集基线值 1 min;用 40 μl 10 mmol/L pH 5.0 的乙酸钠缓冲液冲洗样品池 3 次,后再加入 40 μl 乙酸钠缓冲液,采集基线值 1 min;然后在样品池中加入 40 μl 用乙酸钠缓冲液稀释的总量为 0.5 μg 的 p65 标准蛋白;反应 30 min 后用 PBS/T 冲洗 3 次,并采集基线值 1 min;用 40 μl 1 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液冲洗样品池 3 次,并保留 3 min 以封闭未反应的 NHS;用 40 μl 10 mmol/L HCl 冲洗 3 次,除去传感片上残留的未发生共价结合的 p65 标准蛋白;用 50 μl PBS/T 冲洗 3 次,采集基线值 1 min,4 ℃放置待后进行结合反应。

1.2.2 p65 结合肽的制备 以 pET 42a 为原核表达载体,将 5 条 p65 结合肽(分别为 9 肽、15 肽、15 肽、16 肽和 37 肽,序列见文献[8])以及无关肽(去除 PT5 基因的第 1 个碱基行移码突变即为无关肽,长度为 16 肽)基因插入 pET 42a 载体中,构建 pET 42a GST(谷胱甘肽)/结合肽和无关肽融合蛋白表达载体。IPTG 诱导表达,谷胱甘肽亲和树脂纯化 GST/结合肽融合蛋白,具体方法见文献[8]。

1.2.3 生物传感器工作的原理和基本过程 简言之,生物传感器的工作原理是利用表面等离子共振(surface plasmon resonance)现象监测传感片表面介质的折射率变化所引发的共振角改变,而这一改变与传感片表面结合的生物大分子的量成正比,溶液中游离的分子不影响共振角的大小,因此非常特异、敏感。用生物传感器检测任何生物大分子间相互作用都要经过结合、解离、再生几个步骤。以本实验中 GST-p65 结合肽与 p65 相互作用为例,首先将包被好 p65 标准蛋白的样品池放入生物传感器,平衡 10 min。①基线:首先将包被好抗原的样品池放入生物传感器,用 50 μl 蛋白结合缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.2,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L $MgCl_2$,10 μmol/L $ZnCl_2$,1 mmol/L DTT,0.1 %(体积分数)NP40]冲洗 3 次后平衡 10 min,待基线平稳后采集基线值 5 min。②结合:吸去蛋白结合缓冲液,加入 50 μl 用蛋白结合缓冲液稀释的浓度为 1 μg/mL GST-结合肽融合蛋白液(同时以相同浓度的 GST-无关肽作对照),温度 25 ℃,结合反应 5~10 min,至结合至饱和时吸去蛋白液。③解离:用 50 μl 蛋白结合缓冲液冲洗样品池 3 次,洗脱非特异性结合至结合与解离达到平衡,即反应曲线平稳不再下降为平衡,采集反应曲线值 1 min。④再生:用 40 μl 10 mmol/L HCl 冲洗样品池 3 次,再生传感片。⑤回复基线:再用 50 μl 蛋白结合缓冲液冲洗样品池 3 次,再次回到基线,开始新一轮的结合反应。另外,本实验所用的羧甲基葡聚糖生物传感片为双孔道,在一孔中加入结合肽,而另一孔中则加入同等浓度的无关多肽作为对照。

如上所述,将每种结合肽用蛋白结合缓冲液稀释为 8×10^{-6}、4×10^{-6}、2×10^{-6}、1×10^{-6}、5×10^{-7} mol/L 5 个不同浓度,依次分别测定各浓度结合肽与包被 p65 蛋白的结合、解离速率,并通过随机附送的专用软件 FASTfit 计算各种多肽的亲和常数。亲和常数即解离平衡常数值(dissociation equilibrium

constant，KD ）计算公式为：KD(mol/L) = Kdiss/Kass。

其中 Kdiss 为解离常数，Kass 为结合常数。

1.2.4　p65 结合肽对 NF-κB DNA 结合活性的抑制作用测定

于已包被核因子-κB 顺式作用元件 κB 序列（5′-TGATGG-GACTTTCCT-3′/ 5′-ACTACCCTGAAAGGA-3′）的 96 孔酶联板中加入 150 μl/孔转录因子封闭液，室温孵育 15 min；弃转录因子封闭液后加入 50 μl/孔转录因子封闭液稀释的样品，每一样品做 3 复孔，样品分别为：含 10 ng/μl 的 p65 标准蛋白为阳性对照、含 10 ng/μl 的 p65 标准蛋白同时加入系列浓度（1、10、50、100、200、300、400 μmol/L）GST-p65 结合肽为结合肽抑制 p65 与 κB 序列结合样品，含 10 ng/μl 的 p65 标准蛋白同时加入相同系列浓度 GST-无关肽纯化蛋白为阴性对照的样品，空白对照为加入 50 μl 转录因子封闭液，室温孵育 1 h；加入转录因子封闭液 150 μl/孔洗涤 3 次，每次 4 min，去除洗涤液；加入用转录因子封闭液以 1∶500 稀释的 p65 抗体 100 μl/孔，室温孵育 1 h；加入转录因子封闭液 150 μl/孔洗涤 3 次，每次 4 min，去除洗涤液；加入用转录因子封闭液以 1∶1 000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP 二抗 100 μl/孔，室温孵育 30 min；加入转录因子缓冲液 250 μl/孔洗涤 4 次，每次 4 min，去除洗涤液；加入 TMB 底物，室温孵育 10 min，待液体变蓝后，用 100 μl/孔的终止液终止反应；于 450 nm 和 630 nm 双波长检测 OD 值。p65 结合肽对 p65 与其顺式作用元件结合的抑制百分数计算公式为：（同一浓度 GST-无关肽纯化蛋白 OD - 同一浓度 GST-结合肽 OD）/p65 标准蛋白阳性对照 OD。

1.3　数据分析

采用 IAsys Plus 系统提供的 FASTplot 软件对不同浓度结合物数据资料进行转化和曲线的叠加；并利用 FASTfit 软件对数据资料进行处理、分析。数据的处理过程中，结合及解离反应均同时选择单相和双相反应模式，最后根据计算结果残差的大小和随机性选择最优化反应模式进行结果的比较、分析及其动力学参数的计算。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2　结果

2.1　p65 标准蛋白包被

经 pH 滴定实验显示，用 pH 5.0，10 mmol/L 的乙酸钠缓冲液作为包被缓冲液最利于 p65 蛋白与 CMD 样品池的耦联。另外，将操作说明书推荐的 4 min 包被时间延长至 30 min 才能达到包被足量 p65 的要求。生物传感器测定值为 221 arc seconds，相当于样品池每平方毫米表面包被了 1.11 ng p65 蛋白，见图 1。

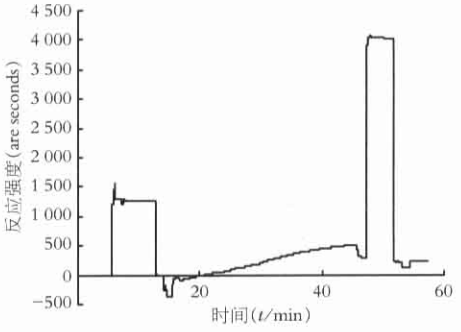


图 1　p65 包被曲线

2.2　p65 结合肽的制备

已获得高浓度高纯度的 GST-p65 结合肽融合蛋白，大小与预计的 31×10^3 相符[8]。

2.3　p65 结合肽结合动力学分析

生物传感器检测 5 条 GST-p65 结合肽融合蛋白结果见图 2，结果显示 5 条融合蛋白均能与 p65 发生相互作用，其中 PT1 多肽的结合能力最强，PT3 次之，PT2 最弱，而对照 GST-无关肽与 p65 间则不发生结合反应。

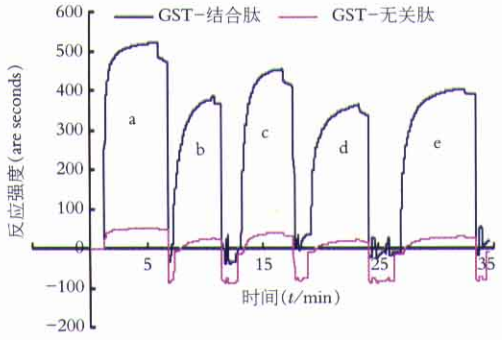
图 3 显示了 PT1 结合肽 5 种不同浓度（8×10^{-6}、4×10^{-6}、2×10^{-6}、1×10^{-6}、5×10^{-7} mol/ L）时结合与解离的动态变化。动态曲线采集数据经 FASTfit 分析计算，GST-PT1 结合肽的亲和常数 KD = 2.67×10^{-7} mol/L。经相同的检测和计算方式分析另外 4 条结合肽的亲和常数，亲和常数见表 1。

2.4　p65 结合肽对 NF-κB DNA 结合活性的抑制效应

竞争性 ELISA 结果表明，融合肽 GST-PT1、GST-PT2、GST-PT3、GST-PT4 和 GST-PT5 均可特异地抑制 p65 与其顺式作用元件的结合，而这种抑制效应具有量效关系，即抑制作用随着多肽浓度的升高而增加，而 GST-无关肽则不影响 p65 与其顺式作用元件的结合。在 5 条多肽中 PT1 的抑制效应优于其他 4 条，见图 4。

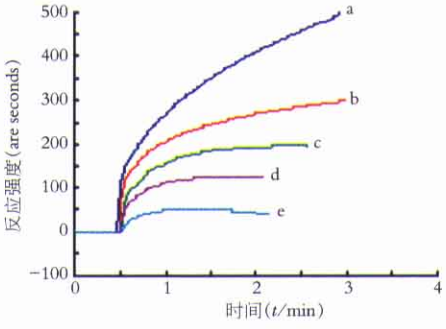
表 1　FASTfit 计算出的 GST-PT1、GST-PT2、GST-PT3、GST-PT4 和 GST-PT5 的动力学相关常数

融合肽	解离常数[$(mol \cdot L^{-1})^{-1} \cdot s^{-1}$]	结合常数(s^{-1})	亲和常数(mol/L)	r
GST-PT1	15 961.1 ±645.12	0.004 256 5 ±0.000 342 1	$2.67 \times 10^{-7} \pm 3.58 \times 10^{-9}$	0.998 739
GST-PT2	4 825.98 ±375.25	0.043521 5 ±0.002 638	$9.02 \times 10^{-6} \pm 4.62 \times 10^{-9}$	0.999 25
GST-PT3	9 346.14 ±486.37	70.010 089 5 ±0.001 042 1	$1.07 \times 10^{-6} \pm 6.12 \times 10^{-8}$	0.999 921
GST-PT4	5 210.99 ±375.53	0.041 820 2 ±0.002 412 3	$8.03 \times 10^{-6} \pm 7.33 \times 10^{-9}$	0.998 873
GST-PT5	9 280.99 ±506.24	0.009 120 2 ±0.000 546 5	$9.83 \times 10^{-7} \pm 1.46 \times 10^{-9}$	0.999 854



a：PT1 结合肽；b：PT2 结合肽；c：PT3 结合肽；d：PT4 结合肽；e：PT5 结合肽

图2 p65 与5条 p65 结合肽相互作用的动力学曲线



a：8 μmol/ L；b：4 μmol/ L；c：2 μmol/ L；d：1 μmol/ L；e：0.5 μmol/ L

图3 不同浓度的 PT1 结合肽与 p65 蛋白结合的结合曲线

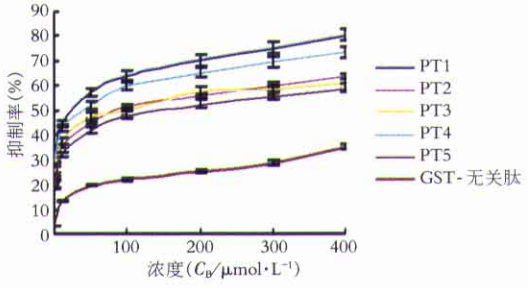


图4 竞争性 ELISA 鉴定结合肽对 NF-κB DNA 结合活性的抑制作用

3 讨论

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome，MODS)是危重病人死亡的主要原因之一。近十几年的研究表明，由多种致病因素诱发机体出现失控性全身炎症反应是 MODS 最重要的病理学基础和形成的根本原因。众所周知，适度的炎症反应对机体具有保护作用，但当机体经受感染及非感染损伤动因如严重烧伤、创伤(包括大的外科手术)、休克、急性坏死性胰腺炎、恶性肿瘤、药物过量等作用时，则可导致过度、失控或脱缰(unbridled)的全身炎症反应，造成宿主自身组织结构和生理功能的广泛损害，最终引起 MODS 甚至死亡。因此，除了原发病的治疗以外，抗炎治疗已成为处理上述病人的基本策略，新型抗炎措施或药物的研究则成为众多学者倾力探索的热点。

许多国内外学者根据炎症发生的机制，对炎症发生的信号通路的各个环节展开了大量的研究工作，如寻找各种炎症介质或效应受体的拮抗剂，但炎症反应是一个复杂的网络，而针对单一的介质或受体进行拮抗则不能达到理想的抗炎效果。另外，一些传统的抗炎药物如皮质类固醇(如地塞米松等)、非甾体类抗炎药物(如消炎痛、布洛芬等)在拮抗机体的过度炎症反应方面，虽疗效确切，但因其作用广泛，故对机体有一定的毒副作用[9]。而 NF-κB 作为一种普遍存在的转录因子，是各种炎症介质和炎症反应放大与延续的多种酶的基因表达的重要调控者，是致炎介质诱发机体发生过渡炎症反应的关键因子[10]。因此，从理论上讲，如能特异地抑制 NF-κB 的过渡活化，则可达到治疗各种急慢炎性疾病的目的。另外，还能一定程度地减轻药物的毒副作用。

生物传感器主要用于实时监测生物大分子之间的相互作用。IAsys 系列生物传感器主要利用谐振镜面(resonant mirror，RM)原理，以激光为光源，监测传感平面介质折射率变化所引发的共振角改变[11]。因这种改变与传感片表面结合的生物大分子的量呈正相关，而溶液中游离的分子不影响共振角的大小。与常规方法相比较，生物传感器具有高特异性、高敏感度、操作简便以及可动态观察大分子之间结合与解离的平衡关系，较为准确地测定分子间相互作用的亲和力等优点，可广泛用于抗原－抗体相互作用的研究[12]，配体－受体的相互作用的研究，以及核酸－核酸、核酸－蛋白、细胞、噬菌体，甚至碳水化合物和脂类分子等相互作用的研究。应用生物传感器研究生物大分子间相互作用的基本操作流程，通常都是首先将 1 种生物大分子结合到传感器的传感片表面，封闭后用于该大分子与其他相关物质的相互作用，获得相应的结合曲线，然后用适当的缓冲系统使样品分子解离，最后是再生过程。通常包被好的传感片(样品池)可多次使用。

蛋白质生物活性的发挥往往是通过识别相应的配体并与之结合而得以实现的，能与靶蛋白功能结构域高亲和力结合的多肽，从理论上讲，能够阻断该蛋白与其配体的结合，进而竞争抑制该蛋白的相应生物活性功能。尽管 p65 结合肽能够与 NF-κB p65 亚基 DNA 结合域特异地结合，但其是否能够竞争性抑制 NF-κB 与其顺式作用元件 κB 序列的结合则需进一步验证。

另外，作为需进行药物开发的先导多肽，其与配基的结合必须具有较高的亲和力。为了进一步验证 p65 结合多肽对 NF-κB 与其顺式作用元件 κB 序列结合的抑制作用，以及 p65 结合多肽与 p65 间相互作用的结合动力学，本实验首先通过生物传感器技术检测了 5 条结合肽与 p65 间相互作用，结果证实 5 条 p65 结合多肽与 p65 间确实存在相互作用。另外，通过检测不同浓度的结合肽对偶联的 p65 蛋白的结合曲线，同时应用 FASTfit 分析软件对结果进行分析和计算，最终确定了 5 条多肽的亲和常数介于 10^{-6} ~ 10^{-7}，即介于 nmol/L ~ μmol/L 水平。另外，应用包被 NF-κB 顺式作用元件的 ELISA 检测试剂盒检测了结合多肽对 p65 与其顺式作用元件 κB 序列的结合的抑制效应，实验结果显示，5 条 p65 结合肽均在一定程度上能够竞争性抑制 NF-κB 与其顺式作用元件 κB 序列的结合。由此说明我们筛选获得的多肽既能抑制 NF-κB 与其顺式作用元件 κB 序列的结合，且他们之间的相互作用又有一定的亲和力，这将为我们以这些先导多肽为模板进一步设计和开发靶向 NF-κB 的抗炎多肽药物奠定了基础。

参考文献：

[1] SEN R, BALTIMORE D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism[J]. Cell, 1986, 47(6): 921 - 928.

[2] WRIGHT J G, CHRISTMAN J W. The role of nuclear factor kappa B in the pathogenesis of pulmonary diseases: implications for therapy [J]. Am J Respir Med, 2003, 2(3): 211 - 219.

[3] YAMAMOTO Y, GAYNOR R B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer [J]. J Clin Invest, 2001, 107(2): 135 - 142.

[4] TAS S W, REMANS P H, REEDQUIST K A, *et al*. Signal transduction pathways and transcription factors as therapeutic targets in inflammatory disease: towards innovative antirheumatic therapy[J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(5): 581 - 611.

[5] BARNES P J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms [J]. Clin Sci (Lond), 1998, 94(6): 557 - 572.

[6] MENG L, MOHAN R, KWOK B H, *et al*. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits *in vivo* antiinflammatory activity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(18): 10403 - 10408.

[7] AGGARWAL B B, TAKADA Y, SHISHODIA S, *et al*. Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine[J]. Indian J Exp Biol, 2004, 42(4): 341 - 353.

[8] 李生茂，梁华平，徐　祥，等. GST pull-down 实验鉴定 NF-κB 相互作用多肽[J]. 免疫学杂志，2006，22(1)：94 - 97.

[9] DUNN D L. Prevention and treatment of multiple organ dysfunction syndrome: lessons learned and future prospects [J]. Surg Infect (Larchmt), 2000, 1(3): 227 - 237.

[10] MARUMO T, SCHINI-KERTH V B, BUSSE R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells[J]. Diabetes, 1999, 48(5): 1131 - 1137.

[11] HALL D. Use of optical biosensors for the study of mechanistically concerted surface adsorption processes [J]. Anal Biochem, 2001, 288(2): 109 - 125.

[12] 蔡　强，李　翔，陈裕泉. 基于表面等离子共振的生物传感器的历史、现状与前景[J]. 国外医学：生物学工程分册，1999，22(2)：65 - 71.

（编辑　陈聪连）

（上接 620 页）

缝合，避免勃起时张力过大而致切口裂开，术后 7 ~ 9 d 拆线。

3　讨论

①本术式简单，易于操作，且耗时短。从备皮到缝合需 14 ~ 18 min，可适合基层医院编制不足时单人开展。②本方法采用了湿纱布内做垫板、外做隔热板与定位，初次操作者可有切割宽度遵循，使切缘整齐美观；湿纱布水分蒸发可以吸收激光过多高热能，减少了对正常阴茎体的损伤，也保护了切口，利于术后切口愈合；同时也防止激光光束反弹伤害操作者。③本方法麻醉时采用肾上腺素，减少了出血的发生；同时，延缓了利多卡因的扩散与吸收，延长了麻醉时间，一般情况下，可以达到 4 ~ 6 h。患者除在清晨 4 ~ 6 点勃起外，几乎没有不适，减少了疼痛、水肿的发生。④本方法采用 CO_2 激光，在切割的同时即止血，减少术中止血[3,4]与切口暴露的时间，减少了术后水肿的发生。⑤本方法摒弃了传统意义上的手术器械，代之以湿纱布，减少了患者的恐惧心理，避免了心因性勃起功能障碍（ED）[5]的发生。⑥同时，对于 9.42 ~ 12.50 cm[2] 甚至更长的不同周径的包皮，湿纱布的可延长性减少了“乙酸纤维素阴茎包皮除去环”等类似产品的垫板。⑦在本临床资料中，据年龄分布来看，4 ~ 30 岁的包茎患者占 59.6%，20 ~ 60 岁的包皮过长患者占 40.3%。这能否说明随着生活条件改善、儿时玩弄生殖器减少而导致包茎患者增多，还有待于大样本资料来证明。

关键词：包皮环切术；激光垫板

中图法分类号：R697.120.5　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 吴阶平. 泌尿外科[M]. 济南：山东科技出版社，1993：1296 - 1297.

[2] 中华男性学编委会. 中华男性学[M]. 北京：军事医学科学出版社，1999：62 - 63，1722 - 1724.

[3] 吴　越，帕尔哈提，王　立. 分层包皮环切术（附 420 例报告）[J]. 临床泌尿外科杂志，2002，17(7)：362 - 363.

[4] 詹前策，张育周. 改良袖套式包皮环切术治疗包皮过长及包茎[J]. 临床泌尿外科杂志，2002，17(8)：407 - 408.

[5] 沈周俊，陈善闻，朱春侠，等. 成人包皮环切术对勃起功能影响的评价[J]. 中华男科学，2004，10(1)：18 - 19.

（编辑　王　红）