文章编号:1000-5404(2006)05-0447-04

论著

shRNA 沉默 VEGF 基因表达对大肠癌细胞生物学特性的影响

吕 伟,张 超,郝 嘉,刘 伟,郝迎学,余佩武 (第三军医大学西南医院普通外科,重庆 400038)

提 要: 目的 观察 Pavu6 +27-VEGF siRNA 重组体在细胞体内表达的 VEGF 短发夹状 RNA(short hairpin RNA, shRNA)对人大肠癌 HCT116 细胞株生物学特性的影响。**方法** 将自行构建的表达短发夹状 RNA 的重组质粒转染到大肠癌 HCT116 细胞株中,以空质粒 Pavu6 +27 转染为对照,经 G418 筛选出稳定表达 shRNA 细胞,行 RT-PCR 检测 VEGF-mRNA 表达的改变,Western blot 检测 VEGF 蛋白表达,流式细胞技术分析细胞周期分布,MTT 比色法检测细胞的生长抑制率。**结果** 成功转染重组体的 HCT116 细胞中 VEGF-mRNA 表达明显下降,约降低为对照组的 61.2% ($P<0.05$)。VEGF 蛋白表达明显下降,光密度分析比较差异有显著性($P<0.05$)。G_0/G_1 期细胞比例增高,另一方面 S 期和 G_2/M 期细胞比例降低,细胞的增殖指数明显降低,实验组细胞增殖指数为(25.63 ±4.54)%,对照组细胞的增殖指数为(31.90 ±2.19)% ($P<0.05$)。**结论** Pavu6 +27-VEGF siRNA 重组体在细胞内表达的短发夹状 RNA 能有效抑制人大肠癌细胞 VEGF-mRNA 和 VEGF 蛋白表达,细胞增殖能力减弱,为质粒介导的 RNAi 技术运用于大肠癌的基因治疗提供一定的实验依据。

关键词: RNA 干扰;短发夹状 RNA;VEGF;增殖
中图法分类号: R394-33; R394.2; R735.34 **文献标识码**: A

Effect of knockdown of VEGF gene expression by shRNA on characteristics of human colorectal cancer cell line

LU Wei, ZHANG Chao, HAO Jia, LIU Wei, HAO Ying-xue, YU Pei-wu (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of knockdown of VEGF expression by recombinant plasmid Pavu6 +27-VEGF siRNA on the characteristics of human colorectal carcinoma cell line HCT116. **Methods** The subcloned recombinant plasmid shRNA was transfected into human colorectal carcinoma cell line HCT116 with DOTAP method. The positive transfected cell clones were screened with G418. The stable transfection and expression of VEGF mRNA in HCT116 were determined by semi-quantitative RT-PCR. The protein expression of VEGF was examined by Western blotting. Distribution of cell cycle was assessed by flow cytometry. The cell growth suppression was analysed by MTT assay. **Results** Compared with the negative control cells, multi RT-PCR and Western blotting showed the expression of VEGF mRNA and protein was down-regulated in the transfected cells ($P<0.05$). The subcloned recombinant plasmid expressing shRNA effectively inhibited HCT116 cell growth and proliferation while empty plasmid had no such specific effect. The proliferation index of the cellls of recombinant plasmid transfection was (25.63 ±4.54)%, while that of the negative control cells was (31.90 ±2.19)% ($P<0.05$). **Conclusion** Recombinant plasmid Pavu6 +27-VEGF siRNA in cells specially inhibit the expression of VEGF mRNA in HCT116 cells, the expression of VEGF in cell culture fluid and the growth of cell line HCT116.

Key words: RNAi interference; short hairpin RNA; VEGF; proliferation

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是正常生物体内抑制特定基因表达的一种现象,它是指当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA(dsRNA)时,该 mRNA 发生降解而导致基因沉默的现象,这种现象发生在转录后水平,又称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing)[1]。体外合成的长链 dsRNA 已被证明在大多数哺乳动物细胞中会产生强烈的细胞毒反应[2],而人工合成的短链 RNA(21 ~ 22 nt)虽可避免这种非特异性作用,但其时效短,最长只能维持 1 周[3]。表达载体可帮助 RNAi 克服上述缺点,因此,利用载体在细胞内转录生成 dsRNA 成为 RNAi 技术运用的主要手段[4]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种重要的促血管形成因子,与大肠癌细胞的增殖密切相

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(2005BB5291)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(2005BB5291)
作者简介:吕 伟(1972 -),男,江苏省金坛县人,硕士研究生,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤的外科及分子生物治疗方面的研究。电话:(023)66935425
通讯作者:张 超,电话:(023)68765274,E-mail:meizhang66889@yahoo.com
收稿日期:2005-10-09;**修回日期**:2005-12-28

关[5]，本研究以质粒 Pavu6 +27 为基础，将针对 VEGF 表达 shRNA 的重组质粒转染入人大肠癌 HCT116 细胞，以期在细胞内表达 shRNA 而诱导 RNAi 效应来沉默 VEGF 基因表达并特异地抑制 HCT116 细胞生长增殖，为大肠癌的基因治疗提供新的靶点和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 表达 VEGF shRNA 质粒（Pavu6 +27-VEGF siRNA）由本室前期实验构建、鉴定并保存[6]。VEGF 的 cDNA 全序列及所选择的干涉位点参照文献[7]设计（潜在靶位点需通过 GenBank 数据库的 BLAST 进行分析）。Pavu6 +27-VEGFsiRNA 所插入的 VEGF 干涉序列（只列出正链序列）为：5′-GGAGTACCCTGATGAGATC-3′（19 nt，由上海生工生物工程技术公司合成），Pavu6 +27-VEGFsiRNA 含有新霉素抗性基因（*neor* 基因）作为正选择的标志。人大肠癌 HCT116 细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

1.1.2 试剂 DMEM 高糖培养基、标准小牛血清购自美国 Hyclone 公司；DOTAP 脂质体转染试剂购自美国 Roche 公司；四氮唑蓝购于 Sino-American Biotechnology 公司；RT-PCR 试剂盒为大连 TaKara 生物公司产品；DL2000 核酸分子量标准、柱离心式质粒抽提试剂盒、柱离心式胶回收试剂盒均购自美国 Promega 公司。兔抗人 VEGF 多克隆抗体及辣根过氧化物酶结合的二抗购于购自 Santa Cruz，Western 所用试剂购于晶美生物工程有限公司。

1.1.3 仪器 流式细胞仪由美国 Coulter 公司生产；酶标仪为 HTS-7000 生物分析仪；其他试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 细胞培养于含 10 % 灭活小牛血清，1×10^5U/ L 青霉素，100 mg/L 链霉素的 DMEM 高糖培养液中，于 37 ℃、5 % CO_2 的培养箱中培养，取对数生长期细胞用于实验。采用 Roche 公司的 DOTAP 脂质体转染试剂盒包裹经灭菌处理的重组质粒（质粒∶脂质体 = 1∶6）。转染前 1 d，换取新鲜培养液（含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养液，37 ℃，5% CO_2 孵箱中培养）后调整浓度为 2×10^5/ml，以每孔 2 ml 接种于 6 孔培养板中培养，待细胞增至 60% ~80% 时，将质粒-脂质体复合物转染至细胞中，18 h 后弃去转染液，换含新鲜培养液继续培养，弃去原培养液，用含 G418 300 μg/ml 的 DMEM 培养液进行筛选收集 G418 抗性细胞。转染了 Pavu6 +27-VEGF siRNA 的 HCT116 细胞简写成 Pavu6 +27-VEGF siRNA HCT116 细胞。转染空质粒的 Pavu6 +27 的 HCT116 细胞简写成 Pavu6 +27 HCT116 作为对照。

1.2.2 半定量 RT-PCR 法检测 VEGF mRNA Pavu6 +27-VEGF siRNA HCT116 细胞中 VEGF-mRNA 表达改变，以 Pavu6 +27 HCT116 为对照。收集培养的 2 种细胞分为 4 组，按 Tripure 操作说明，分别提取总 RNA，PCR 反应体系为：2 μl 反转录产物（模板），两对引物各 1 μl（选用看家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶 GA PDH 基因作为内参照，GAPDH 上游引物的序列为 5′-AATTCAACGGCACAGTCAAGGC-3′，下游引物的序列为 5′-GGATGCAGGGATGATGTTCTGG-3′，扩增片段为 467 bp。VEGF 上游引物序列为：5′-GGAGTACCCTGATGAGATCGAGT-3′，下游引物的序列为：5′-GTCACATCTGCAATGACGTTCG-3′，扩增片断长度 648 bp，引物序列设计合成均由大连 Takara 公司完成）。2.5 μl 10 × Buffer，2 μl 25 mmol/L $MgCl_2$，2 μl 10 mmol/L dNTP mix，0.5 μl *Taq* 酶，去离子水补至 25 μl。反应条件为：预变性 94 ℃ 5 min；94 ℃ 1 min；60 ℃ 50 s；72 ℃ 1 min 共 30 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。取 10 μl 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳，对照分子量标准检测扩增结果，Gel-Doc 2000 型凝胶成像分析系统对目的 DNA 条带进扫描，用 Image-glub 4.0 分析软件测得电泳图谱上每条基因条带的光密度值。计算各个样本 VEGF 强度与 GAPDH 内对照强度的比值，从而反映 VEGF 表达的变化。

1.2.3 VEGF 蛋白的表达检测 选生长密度达 90% 的细胞，用 10 mmol/L PBS 洗 2 次，弃净 PBS；加入 200 μl 1 × SDS 上样缓冲液使细胞充分裂解，用细胞擦子将裂解液刮于一干净的 1.5 ml Ep 管中；加热：100 ℃，10 min；超声破碎细胞；常温离心，1 000 r/min，10 min；将上清移至新的 1.5 ml Ep 管中，以 10 μl/ml 提取液的量加入蛋白酶抑制剂 PMSF。用 BioRad 核酸蛋白仪测定提取液的蛋白浓度，用细胞裂解液将各组总蛋白液稀释成相同浓度，-20 ℃ 保存备用。

分别取空质粒转染组细胞、重组质粒转染组细胞、对照组细胞，总蛋白各 40 μg 与等体积上样缓冲液混匀，100 ℃，5 min 变性，冷却后上样于 10% SDS-PAGE 电泳胶进行电泳分离，然后电转移至硝酸纤维素膜，含 1% 脱脂奶粉的 PBST 室温封闭 2 h，加一抗（1∶100）室温孵育过夜，用 PBST 洗去一抗后加入相应二抗（1∶2 000），室温孵育 2 h，DAB 显色后于凝胶成像系统上成像记录。以 GAPDH 为内参照，观察各组样品 VEGF 蛋白表达是否变化。Mias 图像分析系统测定各条带灰度值，以同一管中 VEGF 和 GAPDH 条带积分光密度值之比作数据分析，以反映 VEGF 蛋白的表达程度。

1.2.4 MTT 比色法检测细胞的抑制率 按参考文献[8]操作。在酶联免疫检测仪（HTS-7000 生物分析仪）上以 570 nm 波长测定各孔光吸收值[D(570)值]。以培养时间为横轴，光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线。计算转染前后两组细胞的生长抑制率，生长抑制率 =[对照组 D(570)值 - 实验组 D(570)值]/对照组 D(570)值 × 100%。

1.2.5 流式细胞技术分析细胞周期分布的影响 对数生长期的细胞用胰酶消化后，以 1.0×10^5/ml 的密度传代、接种，贴壁后加入 DMEM 培养基培养 24 h，加入新培养液，设加等体积 DOTAP 脂质体作为对照组。继续培养至 72 h，胰酶消化成单细胞悬液，冰 PBS 洗涤 2 次，1 000 × g 离心 5 min。弃上清，缓慢加入 -20 ℃ 预冷的 75% 乙醇，4 ℃ 过夜。取细胞悬液，PBS 洗涤，2 000 × g 离心 5 min 后，弃上清。PI 染液 1.0 ml 染 30 min，混合液过 300 目滤网以除去杂质，488 nm 激发波长测定样品，620 nm 带通滤片检测 PI 荧光。每样本收集多于 10 000 个荧光信号。细胞周期分析软件 MultiCycle 分析得到 DNA 指数（DNA index，DI）细胞周期数值，并以下列公式计算细胞增殖指数（proliferation index，PI）：$PI = (S\% + G_2\%)/(G_1\% + S\% + G_2\%) \times 100$

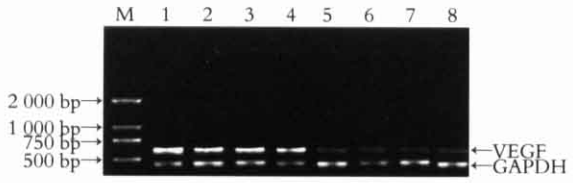
1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10. 0 统计软件进行单因素方差分析和 t 检验。预先用 Homogeneity of Variances 进行方差齐性检验，如方差齐采用 L SD 检验，如方差不齐采用 Tamhane′T2 检验。

2　结果

2.1　半定量 RT-PCR 结果

VEGF 和 GAPDH 引物的扩增基因片段经电泳和 EB 染色后，结果显示扩增片段大小与所设计的大小完全一致，分别为 648 bp 和 467 bp。为电泳染色后结果，其中左侧为对照，右侧为实验组。可见，重组体 Pavu6 +27-VEGF siRNA 转染的 HCT116 中 VEGF-mRNA 的表达较空载体 Pavu6 +27 转染的 HCT116 细胞中 VEGF-mRNA 表达量显著下降(图 1)。统计分析结果表明，重组体 Pavu6 +27-VEGF siRNA 转染的 HCT116 中 VEGF-mRNA 的表达较空载体 Pavu6 +27 转染的 HCT116 细胞中 VEGF-mRNA 表达量显著下降。VEGF 扩增产物的强度与内对照 GAPDH 的比值在对照组和实验组分别为(0.986 ±0.032)和(0.624 ±0.084)实验组约降低为对照组的 61.2%($P<0.05$，$n=4$)。

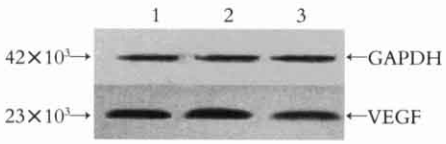


1-4：空质粒转染对照组；5-8：重组质粒转染实验组；M：标准

图 1　空质粒及重组质粒转染前后 HCT116 中 VEGF-mRNA 的表达变化

2.2　West-blot 检测各组细胞 VEGF 蛋白表达

各组细胞经 Western blot 检测分析表明，内参照 GAPDH 为均一显影的条带，但 VEGF 显影条带密度不同。其中，空白对照和空质粒转染组细胞 VEGF 表达量较高，而重组质粒转染组细胞 VEGF 表达量显著下降(图 2)。光密度值分析结果分别为(2.006 ±0.060)、(1.984 ±0.072)、(0.668 ±0.054)，其中重组质粒转染对照组与空白对照组差异具有显著性($P<0.05$)。



1：空质粒转染对照组；2：空质粒转染组；3：重组质粒转染组

图 2　重组质粒转染后 HCT116 细胞 VEGF 蛋白表达的改变

2.3　MTT 比色法检测细胞的抑制率

MTT 实验结果显示：DOTAP 脂质体介导的表达 VEGF 短发夹状 RNA 重组质粒(Pavu6 +27-VEGF siRNA) 对 HCT-116 细胞有明显生长抑制作用，而空载体对细胞生长无抑制作用(组间比较 $P<0.05$)(表 1)。

表 1　MTT 比色法检测重组质粒、空质粒转染对细胞增殖的抑制率 [$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	时间(h)		
	24	48	72
空白对照	2.36 ±0.68	4.98 ±1.57	7.63 ±1.42
空质粒转染组	5.64 ±1.42	8.65 ±2.30	15.32 ±3.52[b]
重组质粒转染组	15.32 ±2.02[a]	28.54 ±3.29[a]	40.32 ±3.56[a]

a：$P<0.05$，与空白对照组比较

2.4　流式细胞仪检测细胞周期分布的改变

转染了重组质粒的 Pavu6 +27-VEGF siRNA HCT116 细胞株，G_0/G_1 期细胞比例增高，另一方面 S 期和 G_2/M 期细胞比例降低，细胞的增殖指数明显降低。转染空质粒的 Pavu6 +27 的 HCT116 细胞的增殖指数无明显改变。见表 2。

表 2　重组质粒、空质粒转染后对结肠癌细胞周期分布的影响 [$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	各细胞周期比值			增殖指数
	G_0/G_1	S	G_2/M	
空白对照	68.13 ±2.14	18.40 ±2.15	13.50 ±2.46	31.90 ±2.19
空质粒转染组	71.13 ±5.14	14.97 ±4.33	13.90 ±3.04	28.87 ±5.14
重组质粒转染组	74.37 ±4.54[a]	11.90 ±3.44[a]	13.73 ±7.80	25.63 ±4.54[a]

a：$P<0.05$，与空白对照组比较

3　讨论

肿瘤的恶性增殖受到多种因素的影响，其中肿瘤血管生长对实体瘤的生长起重要作用，是影响肿瘤生物行为的重要因素。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)是一种重要的促血管形成因子，通过增加微血管的通透性和特异性的与血管内皮细胞受体结合，促进血管内皮细胞的分裂和增殖，进而导致新生血管的生成，具有促血管形成和增加血管通透性的双重功能，在肿瘤的发展、转移及预后等方面均起着重要的作用。VEGF 通过与两种选择性表达在血管内皮细胞上的高亲和力酪氨酸受体的结合来发挥作用。研究表明，在大肠癌中 VEGF 表达明显增高，VEGF 表达与大肠癌生长、转移及肿瘤血管密度密切相关，并可作为判断预后的指标[9]。阻断 VEGF 表达可达到抑制肿瘤生长及转移的目的。

如何有效的抑制 VEGF 的表达是肿瘤治疗的关键所在。目前研究较多的有抗 VEGF 及 VEGF 受体的单克隆抗体[10]、反义寡核苷酸基因干涉[11]、VEGF 短肽[12]等，但效果不甚理想。近几年来兴起的 RNA 干扰技术，为肿瘤的分子生物治疗开辟了新的途径[13]。与传统基因沉默技术相比，RNAi 具有效果强、持续时间长、技术流程简便、短周期，以及在细胞内表达的稳定性、可传递性、高效性等优势，目前这一技术已在肿瘤的基因治疗方面显示出诱人的前景。本实验采用以质粒为载体构建重组体的方法，将 siRNA 对应的 DNA 双链序列克隆入载体内，位于 RNA 聚合酶 III 的启动子后，在体内表达所需的 siRNA 分子。该方法的优点是使 siRNA 直接在体内得到稳定表达，是用于 RNAi 长期研究的较好方法。本研究将在细胞体内表达的 VEGF 短发夹状 RNA 的 Pavu6 +27-VEGF siRNA 重组体通过脂质体法导入人大肠癌 HCT116 细胞株，结果显示：重组体能显著抑制肿瘤细胞 VEGF-mRNA 和

VEGF蛋白表达，对细胞株的增殖有明显抑制作用。本实验结果为质粒介导的RNAi技术运用于肿瘤的基因治疗提供一定的理论依据。但如何提高其转染率（使其达到80 %～90 %）、如何检测质粒在细胞内最长的作用时间、表达shRNA的效率及表达的shRNA能否稳定存在等一系列问题均有待进一步研究。

参考文献：

[1] FIRE A, XU S, MONTGOMERY M K, *et al*. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans [J]. Nature, 1998, 391(6669): 806－811.

[2] SCHERR M, MORGAN M A, EDER M. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells [J]. Curr Med Chem, 2003, 10(3): 245－256.

[3] LEE S S, LEE R Y, FRASER A G, *et al*. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in C. elegans longevity [J]. Nat Genet, 2003, 33(1): 40－48.

[4] BRUMMELKAMP T R, BERNARDS R, AGAMI R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science, 2002, 296(5567): 550－553.

[5] FAN F, WEY J S, MCCARTY M F, *et al*. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells [J]. Oncogene, 2005, 24(16): 2647－2653.

[6] 吕 伟，郝 嘉，郝迎学，等. RNAi抑制大肠癌HCT116细胞株VEGF-mRNA表达的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2005，27(11)：1089－1092.

[7] TAKEI Y, KADOMATSU K, YUZAWA Y, *et al*. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics [J]. Cancer Res, 2004, 64(10): 3365－3370.

[8] CHEN H H, ZHOU H J, FANG X. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives *in vitro* [J]. Pharmacol Res, 2003, 48(3): 231－236.

[9] ROSEN L S. VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances [J]. Oncologist, 2005, 10(6): 382－391.

[10] BREKKEN R A, OVERHOLSER J P, STASTNY V A, *et al*. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice [J]. Cancer Res, 2000, 60(18): 5117－5124.

[11] IM S A, KIM J S, GOMEZ-MANZANO C, *et al*. Inhibition of breast cancer growth *in vivo* by antiangiogenesis gene therapy with adenovirus-mediated antisense-VEGF [J]. Br J Cancer, 2001, 84(9): 1252－1257.

[12] JIA H, JEZEQUEL S, LOHR M, *et al*. Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 283(1): 164－173.

[13] FRASER A. RNA interference: human genes hit the big screen [J]. Nature, 2004, 428(6981): 375－378.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)05-0450-01

反复发作的急性药物性肝炎1例

柏秀娟，张绪清，蒋 黎 （第三军医大学西南医院全军感染病研究所，重庆 400038）

患者，女性，38岁，因"反复肤黄、尿黄8年"入院。1997年3月因感冒口服解热镇痛药6 d后开始出现肤黄、尿黄，伴乏力、厌油、食欲不振，无畏寒、发热，当地医院诊断"急性黄疸型甲型病毒性肝炎"，但肝炎病毒学标志阴性，保肝治疗8 d，肝功能正常，症状消失出院。2000年1月因发热再次服用解热镇痛药后4 d又出现上述症状，自述转氨酶显著升高，皮肤黄染明显，在当地诊所治疗10 d后症状好转。2002年1月再次感冒服用解热镇痛药后5 d出现肤黄、尿黄收入我科住院治疗。入院查体：全身皮肤、巩膜中度黄染，肝剑突下3 cm可扪及，质地中等，有轻微压痛，脾脏肋下未扪及。查肝功能：ALT 1 666 U/L，AST 2 364 U/L，ALP 171 U/L，TBIL 154.9 μmol/L，DBIL 96.9 μmol/L；甲～戊肝病毒学标志均为阴性；抗CMV、抗EBV及自身抗体阴性；肝穿提示：肝细胞浊肿、气球样变，点灶状坏死，广泛肝细胞淤胆。诊断"急性黄疸型病毒性肝炎"，经保肝、对症支持治疗，自觉症状消失，复查肝功能正常后出院。此后多次复查肝功能均正常。2005年9月10日因感冒又服用解热镇痛药后3 d再次出现肤黄、尿黄，无其它自觉症状，第2次入我科住院治疗15 d。患者既往无饮酒史。入院查体：全身皮肤、巩膜中度黄染，未见肝掌、蜘蛛痣，肝、脾肋下未扪及。入院后查肝功能：ALT 2 139 U/L，AST 1 607 U/L，GGT 125 U/L，ALP 215 U/L，TBIL 126.6 μmol/L，DBIL 102.2 μmol/L；甲～戊肝病毒学标志为阴性；抗CMV、抗EBV、自身抗体均为阴性；免疫球蛋白测定IgG 22.1 g/L，余正常；腹部B超未见异常；肝穿示肝组织广泛淤胆、浊肿、点灶状坏死。诊断"急性药物性肝炎"，给予保肝、支持治疗，复查肝功能基本正常且无明显自觉症状后出院。

讨论

本例患者多次检查甲～戊型肝炎病毒学标志为阴性，故可

（下转453页）

作者简介：柏秀娟（1976－），女，山西省运城市人，硕士研究生，医师，主要从事CBTA单核苷酸多态性（SNP）的功能方面的研究。电话：13637825809

收稿日期：2005-11-09；修回日期：2005-12-23